

Université de Sherbrooke

IMPLICATIONS DES HORMONES SEXUELLES, DES OPIOÏDES ET DU GABA DANS
LES MÉCANISMES D'INHIBITION DE LA DOULEUR

Par :

Marie-France Spooner

Sous la supervision de Serge Marchand, Ph.D.

Faculté de Médecine, service de neurochirurgie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

Programme de physiologie et biophysique

Fevrier 2007

© Marie-France Spooner, 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-31452-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-31452-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de médecine et des sciences de la santé

IMPLICATIONS DES HORMONES SEXUELLES, DES OPIOÏDES ET DU GABA DANS
LES MÉCANISMES D'INHIBITION DE LA DOULEUR

Marie-France Spooner

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Marchand, Ph.D: Directeur de recherche

Philippe Sarret, Ph.D: Membre du jury, interne au département

Pedro D'Orléans Juste, Ph.D: Membre du jury, externe au département

Mémoire accepté le 23 février 2007

Sommaire

De façon générale, les femmes sont plus sensibles à la douleur et sont plus prédisposées à vivre des douleurs chroniques que les hommes. L'implication des hormones sexuelles dans ces différences selon le sexe est l'un des sujets d'étude auxquels nous sommes intéressés dans nos laboratoires. Afin de mieux comprendre le rôle des hormones sexuelles dans les processus douloureux, deux projets ont été réalisés. Dans le cadre de ce mémoire, l'implication des opioïdes et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ont été étudiés dans les mécanismes d'inhibition selon les sexes. Par ailleurs, le rôle du récepteur β de l'estrogène dans différents processus de nociception a été analysé.

Tout d'abord, les études antérieures dans nos laboratoires ont démontré que les mécanismes d'inhibition de la douleur, pendant le test à la formaline, ne sont pas recrutés aussi efficacement chez les femelles que chez les mâles et que l'estrogène et la progestérone semblent jouer un rôle important sur ces mécanismes d'inhibition. Dans le but de mieux comprendre ces différences, nous nous sommes intéressés aux neurotransmetteurs impliqués dans cette inhibition ainsi qu'à la relation entre ces neurotransmetteurs et les hormones sexuelles dans ce processus. Ainsi, l'implication des opioïdes et du GABA, des neurotransmetteurs ayant des propriétés analgésiques endogènes, a été étudiée dans les mécanismes d'inhibition de l'interphase du test à la formaline. Des tests à la formaline ont été effectués suite à l'administration de différents antagonistes opioïdiques et gabaergiques chez des rats des deux sexes ayant subi ou non des gonadectomies. Ces expériences ont démontré que les mécanismes d'inhibition semblent impliquer majoritairement les opioïdes chez les femelles alors que les opioïdes sont faiblement impliqués chez les mâles. Par ailleurs, les hormones sexuelles modulent ce mécanisme. D'un autre côté, les mécanismes d'inhibition des mâles possèdent une composante gabaergique qui semble absente chez les femelles. Par conséquent, les neurotransmetteurs ne sont pas impliqués dans

les mêmes proportions selon le sexe dans les mécanismes endogènes d'inhibition de la douleur en interphase.

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré l'implication de l'estrogène dans le domaine de la douleur, par contre le rôle respectif des récepteurs alpha (ER- α) et bêta (ER- β) de l'estrogène dans les processus de nociception demeure inconnu. ER- α semble plus associé aux fonctions reproductrices alors que ER- β semble être le récepteur responsable des autres effets de l'estrogène. Par conséquent, nous avons décidé d'étudier le rôle de ER- β dans différents processus de douleur. Pour ce faire, des tests comportementaux (plaque chaude et formaline) ont été effectués chez des souris des deux sexes exprimant ou non ER- β . Ces expériences ont permis de démontrer que ER- β est impliqué dans les mécanismes d'inhibition, mais pas dans les processus de douleur aiguë et tonique. En fait, les mécanismes d'inhibition semblent être recrutés plus efficacement chez les femelles qui n'expriment pas le récepteur ER- β comparativement à celles qui l'ont. De plus, des analyses immunohistochimiques du c-fos ont permis de corréler cette diminution de comportements nociceptifs en interphase avec une réduction de l'activité neuronale au niveau spinal.

Une meilleure caractérisation de l'implication de ER- β dans les processus douloureux ainsi que de l'implication de différents neurotransmetteurs dans les mécanismes d'inhibition permettra de mieux comprendre les bases neurohormonales à l'origine de ces divergences, dans le but d'orienter le traitement pharmacologique des douleurs chroniques en fonction des sexes.

Table des matières

<i>Sommaire.....</i>	3
<i>Table des matières.....</i>	5
<i>Liste des illustrations</i>	8
<i>Liste des abréviations.....</i>	9
<i>Introduction.....</i>	11
1. La douleur	11
2. Différence entre les hommes et les femmes	11
3. Transmission de la nociception.....	13
3.1 Périphérie	14
3.2 Moelle épinière	17
3.3 Centres supérieurs.....	18
4. Mécanismes endogènes de contrôle de la douleur.....	18
4.1 Mécanismes périphériques.....	19
4.2 Mécanismes spinaux.....	20
4.3 Mécanismes supraspinaux	22
4.3.1 Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN)	22
4.3.2 Contrôle des centres supérieurs	23
4.4 Débalancement des contrôles endogènes.....	24
5. Hormones sexuelles.....	25
5.1 Mécanismes d'action généraux.....	26
5.2 Estrogène	27
5.3 Progestérone.....	28
5.4 Testostérone	29
6. Neurotransmetteurs impliqués dans la modulation de la douleur	30
6.1 Sérotonine et Noradrénaline	30
6.2 Opioïdes	32

6.3 GABA	36
7. Modèles animaux	37
7.1 Stimulations nociceptives	38
7.2 Test à la formaline	39
7.2.1 Mécanismes d'inhibition de la douleur.....	40
7.2.2 Rôles des hormones sexuelles sur le test à la formaline	40
7.2.3 Quantification de la douleur	43
Méthodes	45
8. Animaux.....	45
8.1 Rats Sprague-Dawley	45
8.2 Souris C57BL/6	45
9. Tests de nociception	46
9.1 Test de la plaque chaude.....	46
9.2 Test à la formaline	46
9.2.1 Composés administrés	47
9.2.2 Récupération des tissus.....	48
10. Immunohistochimie du c-Fos.....	49
10.1 Quantification du c-Fos	50
11. Analyses statistiques des données.....	51
11.1 Test de la plaque chaude.....	51
11.2 Test à la formaline	51
11.3 Immunohistochimie du c-Fos	51
Résultats	52
12. Première partie : Implication des opioïdes et du GABA dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez le rat.....	52
12.1 Rôle des opioïdes	52
12.2 Rôles des hormones sexuelles	55
12.3 Rôle des récepteurs opioïdes μ , κ et δ	58

12.4 Localisation du système opioïdérique.....	60
12.5 Implication du GABA.....	63
13. Deuxième partie: Rôles du récepteur bêta de l'estrogène dans différents processus de nociception	65
13.1 Test de la plaque chaude.....	65
13.2 Rôle de ER- β dans le test à la formaline	67
13.3 Immunohistochimie du c-Fos	70
<i>Discussion</i>	73
14. Première section : Implications des opioïdes et du GABA dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez le rat.....	73
14.1 Rôle des opioïdes et des hormones sexuelles	75
14.2 Sous-type de récepteurs impliqués	79
14.3 Localisation du système opioïdérique.....	80
14.4 Implication du GABA.....	82
15. Deuxième partie : Rôle du récepteur bêta de l'estrogène dans différents processus de nociception	84
15.1 Mécanismes d'inhibition de la nociception	84
15.2 Processus aigus de nociception.....	85
15.3 Processus tonique de nociception	86
15.4 Activité neuronale au niveau spinal.....	87
15.5 Aromatisation de la testostérone.....	88
15.6 Neurotransmetteurs associés à ER- β	89
16. Retombés cliniques potentiels	89
<i>Remerciements</i>	91
<i>Références</i>	92

Liste des illustrations

Figures :

Figure 1 : Principale voie de transmission de l'information nociceptive	14
Figure 2 : Principaux récepteurs cutanés et leurs fibres nerveuses.....	15
Figure 3 : Les substances pronociceptives relâchées en périphérie.....	16
Figure 4: Analgésie périphérique et spinale induite par les opioïdes.	20
Figure 5 : La théorie du portillon.....	21
Figure 6: Mécanismes impliqués dans la mise en place du CIDN	23
Figure 7: Effets des hormones sexuelles sur le test à la formaline	42
Figure 8 : Segments lombaires de moelle épinière	50
Figure 9 : Test à la formaline chez des femelles intactes ayant reçu du naloxone	53
Figure 10 : Test à la formaline chez des mâles intacts ayant reçu du naloxone.	54
Figure 11: Test à la formaline chez des femelles OVX ayant reçu du naloxone.....	56
Figure 12: Test à la formaline chez des mâles castrés ayant reçu du naloxone.....	57
Figure 13: Test à la formaline en présence d'antagonistes spécifiques.....	59
Figure 14 : Tests à la formaline en présence de naloxone méthiodide.....	61
Figure 15 : Tests à la formaline en présence d'antagonistes opioïdiques.....	62
Figure 16 : Tests à la formaline en présence de bicuculline.....	64
Figure 17 : Tests de la plaque chaude effectués chez des souris.	66
Figure 18 : Tests à la formaline effectués chez des femelles ER- β KO et WT.....	68
Figure 19 : Tests à la formaline effectués chez des mâles ER- β KO et WT.	69
Figure 20 : Quantification du c-Fos chez des femelles ER- β KO et WT	71
Figure 21 : Quantification du c-Fos chez des mâles ER- β KO et WT	72
Figure 22 : Molécules impliquées dans les mécanismes d'inhibition.	74
Figure 23 : Mécanismes d'inhibition opioïdiques et non opioïdiques.....	77

Tableaux :

Tableau 1 : Affinités des peptides opioïdiques endogènes pour les différents sous- types de récepteurs aux opioïdes.	33
Tableau 2: Antagonistes utilisés lors des tests à la formaline chez les rats	48

Liste des abréviations

ANOVA	Analyse de variance
5-HT	Sérotonine
CIDN	Contrôle Inhibiteur Diffus Nociceptif
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
ER- β	Récepteur bêta de l'estrogène
KO	Animaux mutants pour un gène
HS	Hormones Sexuelles
LC	locus coeruleus
NA	Noradrénaline
NRM	Noyau Raphée Magnus
OVX	Ovariectomisée
SGPA	Substance Grise Périacqueducule
SNC	Système nerveux central
TENS	Stimulation électrique transcutanée
WT	Animaux de type sauvage

À mes parents,
Pour les raisons d'usage
et d'autres, surtout

Introduction

1. La douleur

La douleur est la principale cause de consultation d'un professionnel de la santé (Koch 1986). Cette expérience universelle et subjective est décrite par *L'International Association for the Study of Pain* comme étant une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable résultant d'une lésion potentielle ou décrite en de tels termes (IASP 1982, IASP 1979). La douleur relève de la perception, elle est très complexe et fait intervenir plusieurs composantes distinctes. Des liens étroits existent entre la transmission de l'information nociceptive, l'intensité ressentie, l'aspect désagréable occasionné et l'aspect comportemental adopté en réponse à cette situation. Pour ressentir une douleur, une série d'événements doivent être enclenchés pour ultimement mener à l'intégration de l'information nociceptive au niveau des centres supérieurs comme étant de la douleur. Cette transmission ne suit pas une seule trajectoire simple et linéaire. En fait, plusieurs mécanismes peuvent se mettre en place pour moduler la transmission de l'information douloureuse tout au long de son trajet soit en facilitant la transmission, soit en l'inhibant. Par ailleurs, une multitude de facteurs tant physiologiques que psychologiques peuvent aussi moduler la douleur selon les différentes circonstances. Par conséquent, il n'est pas surprenant de constater de nombreuses distinctions dans la perception de la douleur entre différentes personnes.

2. Différence entre les hommes et les femmes

Des différences existent entre les hommes et les femmes à plusieurs niveaux, certaines sont très apparentes tel qu'anatomiques et physiologiques alors que d'autres sont plus subtiles. Il a été démontré que les seuils de perception pour la majorité des modalités sensorielles sont différents entre les hommes et les femmes. En effet, le

goût, l'odorat et le toucher sont plus développés chez la femme que chez l'homme (Velle 1987). Il n'est donc pas étonnant qu'il existe aussi des différences au niveau de la perception et de la modulation de la douleur.

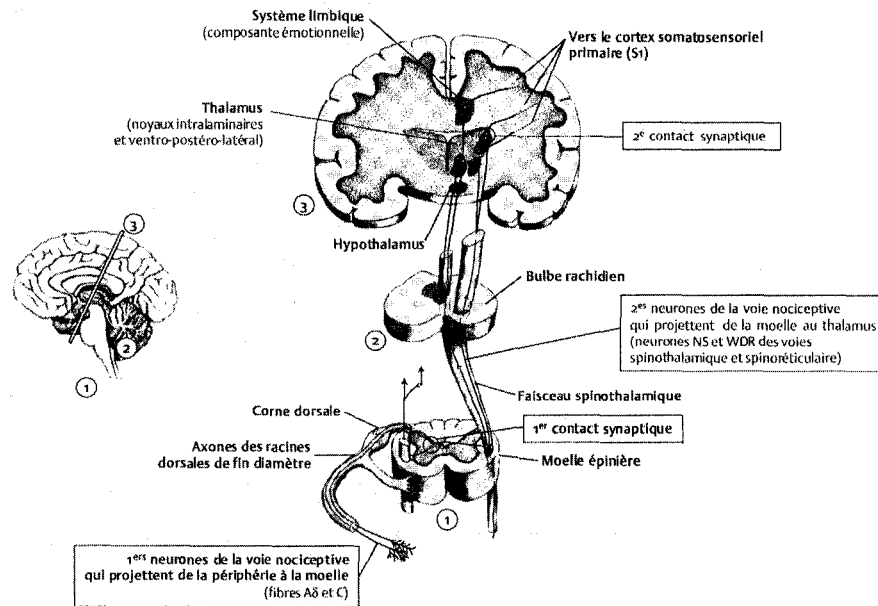
De façon générale, les femmes ont des seuils de douleur et de tolérance à la douleur plus faibles que les hommes pour des stimulations douloureuses équivalentes (Riley, III et al. 1998). Le seuil de douleur correspond à la plus faible intensité de stimulation qui occasionne une sensation de douleur alors que le seuil de tolérance correspond à la douleur la plus importante que la personne peut supporter. De plus, les femmes sont plus susceptibles de vivre des douleurs récurrentes, des niveaux de douleur plus sévères et de la douleur de plus longue durée (Unruh 1996). Elles sont aussi plus souvent atteintes de douleurs chroniques que les hommes (Berkley 1997). En fait, les maladies de douleur chronique qui touchent au cou et à la tête, les maladies d'origine musculo-squelettique ou viscérale et celles d'étiologie auto-immune ont une plus forte prévalence féminine (Merskey & Bogduk 1994). La majorité des études effectuées chez les animaux arrivent aux mêmes conclusions que celles obtenues chez les humains : les femelles ont des seuils de nociception inférieurs aux mâles pour la majorité des modalités expérimentales (Mogil et al. 2000). Chez l'humain, plusieurs facteurs ont été pris en considération pour expliquer cette réalité, qu'ils soient psychosociaux, socioculturels ou biologiques (Myers et al. 2003). Cependant, certaines évidences nous permettent de croire que les hormones sexuelles jouent un rôle important dans ces différences de perception (Fillingim 2000). En effet, il a été démontré que les seuils de douleur chez la femme varient durant le cycle menstruel, comme le font les niveaux plasmatiques d'œstrogène et de progestérone tout au long du cycle. Par ailleurs, la phase folliculaire semble être associée au seuil de douleur le plus élevée pour la majorité des stimulations (Riley, III et al. 1999). Cette période correspond à des niveaux élevés en œstrogène. D'un autre côté, la phase menstruelle semble être plus propice aux attaques de migraines (Aloisi 2000) et les patients souffrant de fibromyalgie rapportent plus de douleurs durant la période péri-menstruelle (Anderberg et al. 2000). Lors de la grossesse, de grands changements

sont aussi observés dans les seuils de douleurs et dans la fréquence de certaines pathologies de douleur chronique. En fait, les seuils de douleur sont plus élevés, particulièrement vers la fin de la gestation et lors de l'accouchement (Whipple et al. 1990, Cogan & Spinnato 1986), ce qui correspond à des périodes où les niveaux d'œstrogène et de progestérone sont beaucoup plus élevés qu'à la normale. De plus, il n'y a aucune différence dans la perception de la douleur entre les filles et les garçons en bas âge, les différences apparaissent seulement après la puberté (Hogeweg et al. 1992), lorsque les niveaux d'hormones sexuelles commencent à être différents selon le sexe. Par ailleurs, ces différences de perception de la douleur s'estompent avec l'âge (Von et al. 1988), tout comme les différences concernant les taux d'hormones entre les hommes et les femmes. Ces observations renforcent l'implication des hormones sexuelles dans la perception et la modulation de la douleur selon le sexe. Par contre, les rôles respectifs de chaque hormone sexuelle dans les mécanismes de douleur ainsi que leurs modes d'action sont peu connus et nécessitent d'être étudiés plus en profondeur. Ce qui est aussi le cas de l'implication de certains neurotransmetteurs tels les opioïdes et le GABA. Afin de bien situer la problématique de mon projet de maîtrise, les processus de transmission de la douleur ainsi que les mécanismes endogènes de contrôles seront détaillés, avant d'aborder les principaux aspects du projet c'est-à-dire les hormones sexuelles, leurs récepteurs et des neurotransmetteurs ayant des rôles importants dans la modulation de la douleur.

3. Transmission de la nociception

Afin que la douleur soit perçue et intégrée au niveau des centres supérieurs, une série d'événements doit avoir lieu (voir figure 1). Les mécanismes de transmission nociceptive à partir de la périphérie jusqu'aux centres supérieurs en passant par la moelle épinière seront décrits en détail dans les sections suivantes, et ce, pour chaque niveau.

Figure 1 : Principale voie de transmission de l'information nociceptive



Cette voie fait intervenir trois neurones. L'information de la périphérie est transmise par un premier neurone jusqu'à la moelle où un premier contact synaptique s'établit avec le deuxième neurone. Celui-ci apporte l'influx au niveau des centres supérieurs et fait un deuxième contact synaptique avec le troisième neurone. Ce dernier achemine le message vers le système limbique et les centres corticaux.

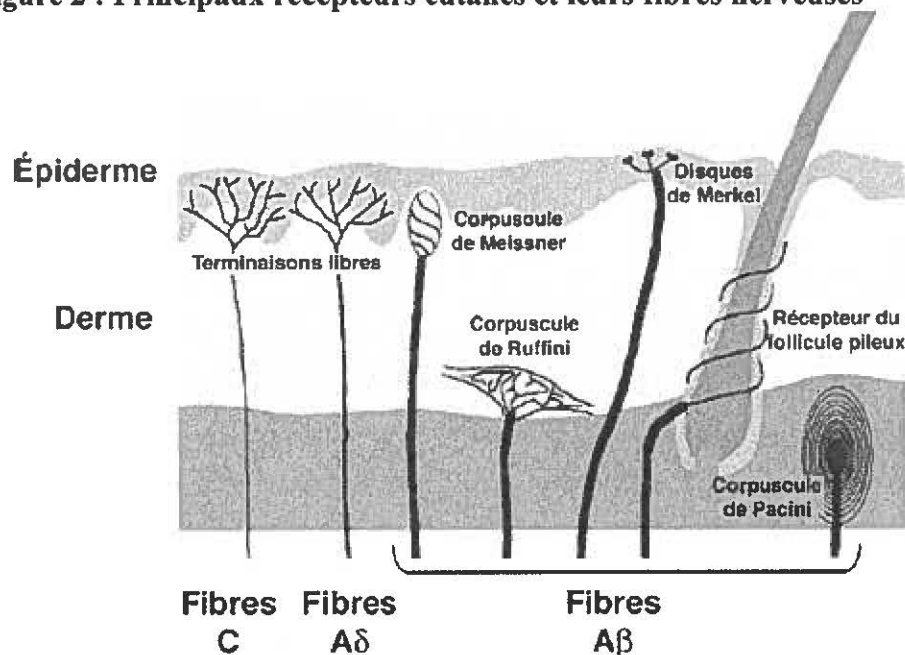
Source : Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, ch 1, p.6. Les presses de l'Université de Montréal.

3.1 Périphérie

Plusieurs types de récepteurs impliqués dans les perceptions sensorielles tactiles et douloureuses se retrouvent un peu partout au niveau du corps (peau, muscles, tendons et viscères) et sont associés à différentes fibres nerveuses. Il existe trois classes de fibres nerveuses somatiques (Aβ, Aδ et C) qui sont caractérisées par le type d'informations (nociceptive ou non) qu'elles transmettent, ainsi que par leur vitesse de conduction. Les fibres Aδ et C transmettent les informations nociceptives et sont associés à des terminaisons libres (voir figure 2). Quant aux fibres Aβ, elles sont

responsables de la transmission des informations tactiles et sont connectées à des récepteurs bien différenciés tels que les corpuscules de Meissner qui répondent aux faibles pressions et les corpuscules de Ruffini et de Pacini qui répondent aux vibrations de basses et de hautes fréquences respectivement (Julius & Basbaum 2001).

Figure 2 : Principaux récepteurs cutanés et leurs fibres nerveuses



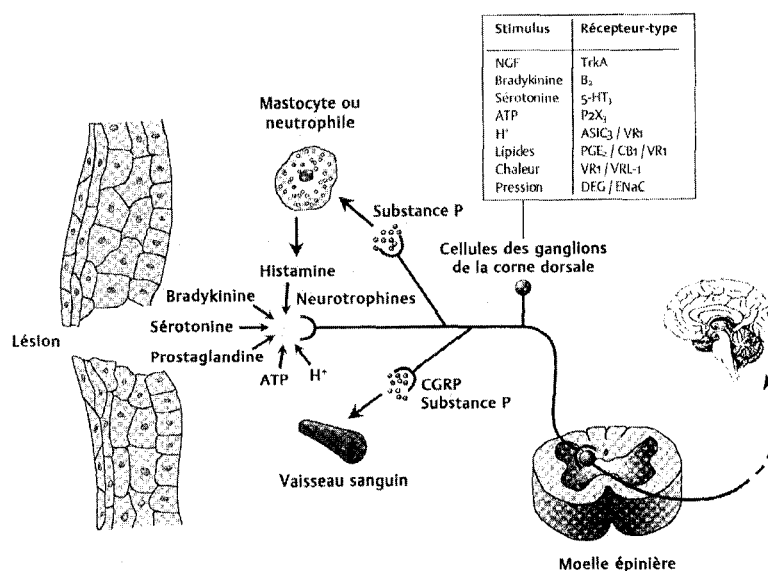
Les fibres Aδ et C, responsables de la transmission des informations nociceptives, sont associées à des terminaisons libres, alors que les fibres Aβ, responsables des informations tactiles, sont associées à différents types de récepteurs bien différenciés.

Source : Le Bars, D. & Willwe, J.-C., Physiologie de la douleur, EMC- Anesthésie réanimation 1 (2004) 227-266.

De façon générale, pour que l'information nociceptive soit transmise, il doit y avoir activation des terminaisons nerveuses libres qui sont en fait les nocicepteurs périphériques. Différents types de nocicepteurs vont répondre préférentiellement selon la nature de la stimulation (thermique, mécanique ou bien chimique). Suite à une stimulation douloureuse suffisamment importante, une multitude de substances

sont relâchées soit par des leucocytes ou bien par les macrophages au niveau du site de lésion ce qui augmentera la sensibilité des nocicepteurs. Parmi ces substances, il y a la substance P, la bradykinine, des prostaglandines, l'histamine, la sérotonine, l'adénosine triphosphate (ATP), des interleukines, l'interféron et des facteurs de croissance tumorale (Le Bars & Adam 2002). Certaines composantes de la «soupe inflammatoire» (ex : ATP, sérotonine, lipides) peuvent altérer l'excitabilité membranaire directement en interagissant avec les canaux ioniques situés à la surface des nocicepteurs. Alors que d'autres substances, telles que la bradykinine et le facteur de croissance neuronal (NGF), se lient à des récepteurs métabotropiques et induisent leurs effets via une cascade de signalisation (Julius & Basbaum 2001). Cette activation des nocicepteurs induira un potentiel d'action et l'information nociceptive sera ainsi acheminée jusqu'au niveau spinal (figure 3).

Figure 3 : Les substances pronociceptives relâchées en périphérie.



En réponse à une lésion, certaines molécules sont libérées et induisent une sensibilisation des nocicepteurs. Lors que la stimulation est suffisamment importante, un potentiel d'action est créé et permet la transmission de l'information nociceptive via les fibres nerveuses jusqu'à la moelle.

Source : Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, ch 1, p.14. Les presses de l'Université de Montréal.

3.2 Moelle épinière

En réponse à la libération périphérique de nombreuses molécules, il y a activation des nocicepteurs et ensuite transmission de l'information nociceptive via les neurones primaires, situés en périphérie et dont le corps cellulaire est situé dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière. Ces neurones permettent d'acheminer le signal vers les cornes dorsales de la moelle où un premier contact synaptique s'établit. Ce contact se fait avec le neurone secondaire, particulièrement au niveau des laminae supérieures (I et II) ainsi qu'au niveau des laminae plus profondes (IV et V). Ces neurones qui projettent l'information vers le thalamus et le tronc cérébral, sont soit des neurones nociceptifs spécifiques ou bien des non spécifiques. Les neurones nociceptifs spécifiques, comme leur nom l'indique, vont répondre seulement aux stimulations potentiellement douloureuses pour l'organisme provenant des fibres A δ et C. Ces neurones spécifiques sont principalement situés dans les laminae supérieures. Quant à eux, les neurones nociceptifs non spécifiques, aussi appelés neurones à large gamme dynamique, vont répondre à des stimulations allant de non nociceptives à nociceptives. Par conséquent, ils reçoivent l'information des fibres A β aussi bien que des fibres A δ et C. Ces neurones se situent principalement au niveau des laminae IV et V (Marchand 2005).

Deux groupes principaux de neurotransmetteurs assurent la transmission des messages nociceptifs périphériques vers les neurones spinaux. Tout d'abord, les acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate) et des peptides tels que la substance P et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) assurent la neurotransmission à proprement parler. Il existe aussi plusieurs neuromédiateurs (substance P, sérotonine, prostaglandines, noradrénaline, GABA, opioïdes et autres) qui viendront moduler cette transmission de l'influx nociceptif vers les centres supérieurs (Julius & Basbaum 2001).

3.3 Centres supérieurs

Une fois que le contact synaptique est établi au niveau de la moelle, l'information nociceptive chemine vers les centres supérieurs via deux principales voies; le faisceau de la voie spinothalamique latéral et le faisceau médian de la voie spinoréticulaire. Le premier faisceau projette les informations nociceptives qui proviennent principalement des laminae I et IV-VI de la moelle épinière. Ce faisceau spinothalamique permet une projection directe vers les noyaux thalamiques latéraux. À ce niveau, un deuxième contact synaptique s'effectue de façon à ce que le neurone tertiaire achemine l'information jusqu'au cortex somatosensoriel primaire et secondaire. Cette voie joue un rôle important dans la localisation et la perception de l'aspect sensoridiscriminatif de la douleur. Le faisceau spinoréticulaire, pour sa part, achemine principalement les informations nociceptives provenant des laminae profondes VII et VIII vers les noyaux thalamiques médians ainsi que vers certaines régions du tronc cérébral tel que la substance grise périaqueducale (SGPA) et les noyaux du raphé (*nucleus raphe magnus* (NRM)). À ce niveau, les neurones tertiaires vont ensuite transmettre l'influx vers différentes parties du système limbique. Cette voie est par conséquent impliquée dans la perception de l'aspect désagréable de la douleur (Marchand 2005). De façon parallèle à la transmission de la nociception, des mécanismes sont mis en place pour faciliter ou bien inhiber l'acheminement de l'information douloureuse, ce sont les mécanismes endogènes de contrôle de la douleur.

4. Mécanismes endogènes de contrôle de la douleur

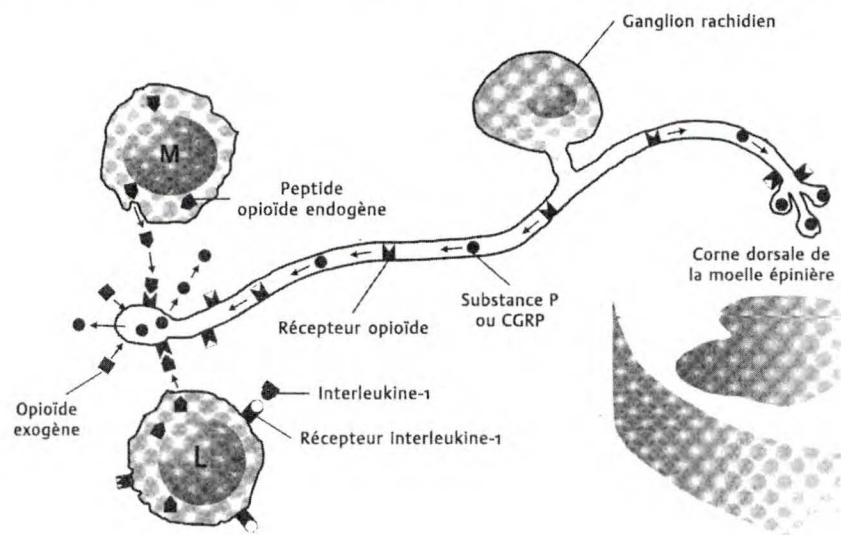
La perception de la douleur résulte d'une balance entre l'activité des systèmes excitateurs et inhibiteurs. En fait, il existe plusieurs mécanismes qui sont capables de moduler la transmission de la douleur, certains d'entre eux vont faciliter la transmission de l'influx nociceptif alors que d'autres vont l'inhiber (Millan 2002). Lors de nos projets de recherche, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à

la deuxième catégorie; les mécanismes d'inhibition de la douleur. Ces mécanismes d'inhibition peuvent agir à tous les niveaux de la transmission nociceptive, c'est-à-dire en périphérie, au niveau spinal ainsi qu'au niveau supraspinal. Le fonctionnement de quelques mécanismes d'inhibition sera détaillé dans les sections suivantes, et ce, pour chacun des trois niveaux impliqués dans la modulation de la transmission de l'information nociceptive.

4.1 Mécanismes périphériques

Dès le départ, la transmission de l'information nociceptive peut être modulée par la mise en place de mécanismes d'inhibition périphériques. La libération de substances inflammatoires produit une augmentation de l'expression des récepteurs aux opioïdes au niveau des terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires (Stein et al. 2001). De plus, dans des conditions de stress ou lors de la libération de cytokines suite à une blessure, des opioïdes endogènes sont libérés par les monocytes, les macrophages ou bien par les lymphocytes. Les opioïdes ainsi libérés agissent donc sur leurs récepteurs directement au niveau des terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires (figure 4). En se liant à leurs récepteurs qui sont couplés à des protéines G de type $G\alpha_{i/o}$, les opioïdes provoquent ainsi une hyperpolarisation membranaire par ouverture des canaux potassiques. Cette hyperpolarisation entraîne une diminution de l'excitabilité cellulaire, et par conséquent une diminution de la transmission nerveuse, en direction de la moelle épinière, associée à la stimulation douloureuse (Stein et al. 2001).

Figure 4: Analgésie périphérique et spinale induite par les opioïdes.



Suite à une stimulation douloureuse, il y a relâche de cytokines qui permettent la libération d'opioïdes endogènes par les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. Ces opioïdes agissent sur leurs récepteurs qui sont situés en périphérie ainsi que sur la corne dorsale de la moelle épinière de façon à diminuer la libération de neuropeptides excitateurs pro-inflammatoires.

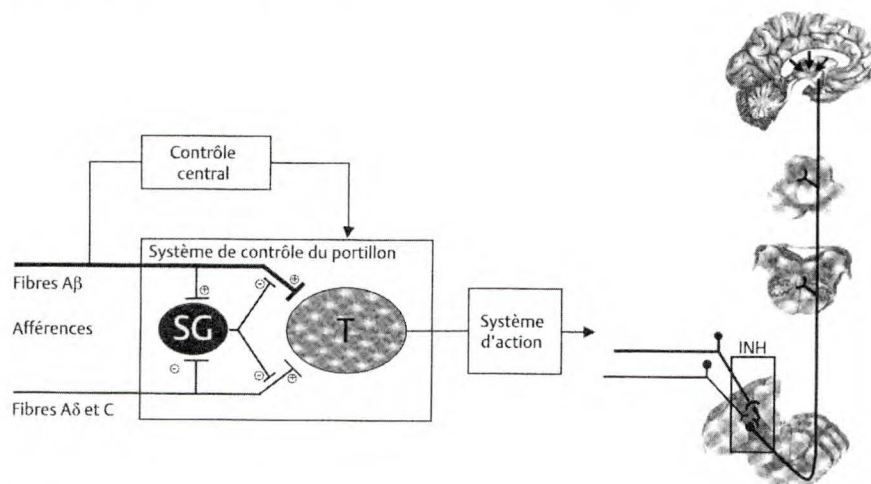
Source : Chauvin M, Beaulieu P. 2005. Pharmacologie des opioïdes. In Pharmacologie de la douleur, ed. P Beaulieu, 2:39-77. Les presses de l'Université de Montréal.

4.2 Mécanismes spinaux

Il existe plusieurs mécanismes d'inhibition qui peuvent se mettre en place au niveau spinal et être modulés par plusieurs neurotransmetteurs tels que le GABA, la glycine, la substance P, le glutamate, la sérotonine, la noradrénaline et les opioïdes (Millan 2002). Par contre, nous allons nous concentrer sur certains d'entre eux, plus pertinents au projet. Le mécanisme d'inhibition nommé la théorie du portillon décrit par Melzack & Wall en 1965 se retrouve au niveau spinal. Ce mécanisme est basé sur le fait que le recrutement des fibres A β , responsables de la transmission de l'information tactile, permet l'activation d'interneurones inhibiteurs au niveau de la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle épinière (figure 5). Cet interneurone diminue la transmission des informations nociceptives en provenance des fibres A δ et C. Ainsi, le recrutement des fibres A β par le toucher, le massage

léger ou la stimulation électrique transcutanée à basse intensité (TENS) peut mener à une analgésie localisée pour la région atteinte (Melzack & Wall 1965). Il est proposé que l'analgésie induite par le TENS puisse être de nature opioïdérique ou bien non opioïdérique dépendamment de la fréquence utilisée (Sluka & Walsh 2003). Par ailleurs, au niveau spinal, nous retrouvons aussi, des mécanismes d'inhibitions médiés par des opioïdes. Les opioïdes peuvent se lier à leurs récepteurs situés en grande concentration au niveau des terminaisons centrales des neurones afférents primaires ainsi qu'au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Mansour et al. 1995). Ainsi, les opioïdes peuvent réduire la transmission nociceptive au niveau spinal par le même mécanisme d'hyperpolarisation qu'en périphérie.

Figure 5 : La théorie du portillon



Lorsque les fibres Aβ sont recrutées, un interneurone inhibiteur est activé de façon à réduire la transmission des informations nociceptives pour une section de moelle associée à la stimulation tactile.

Source : Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, ch 1, p.24. Les presses de l'Université de Montréal.

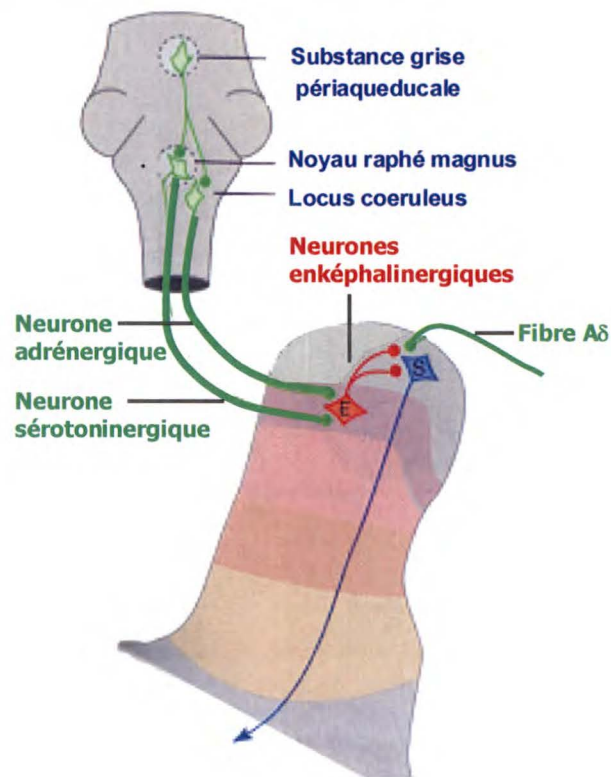
4.3 Mécanismes supraspinaux

Deux principales catégories de mécanismes d'inhibition de la douleur se retrouvent au niveau des centres supérieurs. Premièrement, il existe des mécanismes descendants qui produisent une inhibition diffuse des messages nociceptifs pour tout le corps. Deuxièmement, certaines techniques permettent de moduler différents aspects de la douleur en agissant directement sur les structures du SNC qui sont responsables de l'intégration de la douleur.

4.3.1 Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN)

Suite à une stimulation nociceptive, l'information est transmise au niveau des centres supérieurs via la voie spinothalamique et en même temps, des afférences sont envoyées vers différentes régions du tronc cérébral tel que la SGPA et NRM activant ainsi le CIDN. Une fois activées, ces régions envoient des projections sérotoninergiques et noradrénergiques à tous les niveaux de la moelle afin de stimuler des neurones enképhalinergiques, permettant ainsi la relâche d'enképhalines au niveau des laminae supérieures des cornes dorsales (figure 6) (Le Bars et al. 1979a, Le Bars et al. 1979b). Cette libération d'opioïdes réduira la transmission de l'information nociceptive subséquente pour toutes les régions du corps, ce qui rend ce mécanisme diffus comparativement aux mécanismes spinaux qui sont localisés (Talbot et al. 1989, Talbot et al. 1987, Dickenson et al. 1981).

Figure 6: Mécanismes impliqués dans la mise en place du CIDN



Lors de la transmission de l'information nociceptive de la moelle aux centres supérieurs, des régions du tronc cérébral (SGPA, NRM et LC) sont activées et envoient des projections sérotoninergiques et noradrénergiques au niveau des cornes dorsales de la moelle afin de stimuler des interneurons inhibiteurs à libérer des enképhalines de façon diffuse. Ces opioïdes inhibent la transmission du message nociceptif provenant de la périphérie.

Source : adapté de Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L. et Squire, L.R. Fundamental Neuroscience, Academic Press, San Diego, 1999, p.777.

4.3.2 Contrôle des centres supérieurs

Certaines techniques ont démontré que la manipulation cognitive a des répercussions intéressantes sur la perception de la douleur. En fait, la relaxation, l'hypnose et les attentes sont de très bons exemples. Il a été démontré que les techniques de relaxation peuvent avoir des effets bénéfiques en réduisant les tensions musculaires et le stress émotif pouvant être associé à une douleur (Thomas 1988, Linton & Gotestam 1984). Par ailleurs, l'hypnose, qui est caractérisée par un état de conscience altéré souvent

accompagné d'une relaxation profonde (Spiegel 1991), a fait ses preuves dans le domaine de la douleur (Rainville et al. 2002, Rainville et al. 1999). Plusieurs études ont démontré que cette technique pouvait être utilisée pour réduire et contrôler certaines douleurs telles que les douleurs associées à des brûlures importantes, des chirurgies mineures, des cancers et des accouchements (Miller et al. 1991, Valente 1991, Kuttner 1988, Patterson et al. 1987, Barber & Gitelson 1980).

La douleur peut donc résulter d'une augmentation du message nociceptif, mais aussi d'une diminution ou d'une absence d'inhibition. Ainsi, le bon fonctionnement des mécanismes d'inhibition mentionnés ci-dessus est essentiel, afin de ne pas conduire à des problèmes de perception douloureuse. Il existe plusieurs modifications, dont les causes demeurent mal comprises, qui induisent des déséquilibres des contrôles endogènes menant ainsi à des problèmes de perception nociceptive.

4.4 Déséquilibre des contrôles endogènes

Aussitôt que l'équilibre entre les afférences nociceptives et les mécanismes endogènes de contrôle de la douleur (facilitateurs et inhibiteurs) est modifiée, la possibilité de percevoir de façon inappropriée des douleurs augmente. Que ce soit une sensibilisation ou une désensibilisation de certains récepteurs, un changement au niveau de la synthèse, de la relâche ou bien de la recapture d'un neurotransmetteur impliqué dans la modulation de la douleur, ces modifications mènent à des déséquilibres des processus nociceptifs. Une modification des niveaux de sérotonines ou de noradrénalines pourrait induire un dérèglement des systèmes inhibiteurs, puisque ces deux neurotransmetteurs sont impliqués dans les CIDN. Les propriétés diffuses de ce mécanisme d'inhibition portent à croire qu'un déséquilibre à ce niveau pourrait mener à des douleurs diffuses (Julien & Marchand 2005). Chez les patients fibromyalgiques, qui ont des douleurs diffuses au niveau des muscles et des tendons, une réduction de la concentration de ces neurotransmetteurs (5-HT et NA) a été observée au niveau du liquide

céphalorachidien (Bradley et al. 2000, Russell 1998). Par ailleurs, ce syndrome de douleurs chroniques à prévalence féminine semble être associé à un déficit dans les mécanismes endogènes de contrôles de la douleur (Julien & Marchand 2005, Pielsticker et al. 2005, Staud et al. 2001). De plus, les hormones sexuelles sont impliquées dans ce syndrome et jouent, de façon générale, un rôle important dans les mécanismes de perception et de modulation de la douleur (Gaumond et al. 2005, Aloisi 2003, Gaumond et al. 2002, Aloisi 2000, Fillingim 2000). Plusieurs études se sont intéressées aux implications des hormones sexuelles dans les processus de nociception, par contre plusieurs interrogations demeurent. Pour toutes ces raisons, une importante section de ce mémoire sera consacrée à décrire en détail ce qui est connu concernant les rôles de l'estrogène, de la progestérone et de la testostérone dans les mécanismes nociceptifs, afin de mieux situer les objectifs de cette étude.

5. Hormones sexuelles

Il existe trois principales hormones sexuelles (HS), l'estrogène, la progestérone et la testostérone. Ce sont tous des stéroïdes formés à partir du cholestérol grâce à des modifications enzymatiques. Malgré la tendance d'associer l'estrogène et la progestérone comme étant des hormones femelles et la testostérone comme étant une hormone mâle, ces trois hormones sont synthétisées aussi bien chez l'homme que chez la femme. Par contre, c'est le niveau de chaque hormone qui varie selon le sexe. Les niveaux d'estrogène et de progestérone sont élevés chez la femme alors que ce sont ceux de la testostérone chez l'homme. Les HS sont essentielles pour la reproduction, mais sont aussi impliquées dans plusieurs autres fonctions importantes telles que les processus cognitifs, les fonctions immunitaires, la réparation neuronale, les comportements et la douleur (Aloisi 2003). Les HS sont principalement formées au niveau des gonades (ovaires et testicules). Les glandes surrénales des humains ont aussi la capacité de produire des HS, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs puisqu'ils ne possèdent pas l'enzyme P450c17 nécessaire pour produire des HS au

niveau des surrénales. De plus, des HS peuvent être produites par la conversion d'autres HS au niveau du tissu adipeux et du foie, mais aussi *de novo* au niveau du cerveau (Mensah-Nyagan et al. 1999).

5.1 Mécanismes d'action généraux

Les HS sont des composés très liposolubles, elles peuvent donc passer à travers les membranes cellulaires par diffusion et se lier à des récepteurs nucléaires qui leur sont propres : récepteur aux androgènes (AR), récepteur de la progestérone (PR) et récepteurs à l'estrogène alpha et bêta (ER- α et ER- β) (Tsai & O'Malley 1994). Cette liaison permet au récepteur d'entrer au niveau des noyaux dans les cellules ciblées. Une homodimérisation ou une hétérodimérisation des récepteurs se produit, dépendamment des situations, permettant la liaison des récepteurs à l'ADN. Les HS induisent ainsi la transcription de gènes cibles, menant à la production de protéines. C'est en utilisant ce type de mécanisme, qui nécessite généralement quelques heures, que les HS peuvent produire leurs effets dits génomiques. Les récepteurs nucléaires des HS sont très présents au niveau du SNC et en périphérie sur plusieurs organes cibles des HS. Par contre, le patron d'expression de ces récepteurs est légèrement différent selon le sexe. Les HS ont aussi des actions de nature non génomiques, qui sont très rapides, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. En fait, les hormones peuvent agir directement ou par l'intermédiaire d'un site de liaison sur la membrane plasmique ou encore par liaison de protéines membranaires (Deroo & Korach 2006). Ces actions directes permettent de moduler l'activité neuronale. Les HS peuvent altérer la perméabilité membranaire pour certains neurotransmetteurs ou pour leurs précurseurs en agissant directement sur les membranes cellulaires. De plus, les actions non génomiques des HS peuvent être au niveau de la synthèse, de la relâche et de la recapture de neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la noradrénaline et les endorphines (Marcus 1995).

5.2 Estrogène

Il existe deux types de récepteurs nucléaires (ERs) qui sont responsables des actions génomiques de l'estrogène, les récepteurs alpha (ER- α) et les récepteurs bêta (ER- β). Ces récepteurs sont présents en grande quantité au niveau du SNC (Shughrue et al. 1997). Des études neuroanatomiques révèlent que les ERs sont présents dans les régions impliquées dans les réponses nociceptives, telles que l'hypothalamus, le tronc cérébral et le système limbique ainsi que dans certaines régions impliquées dans la modulation de la douleur (substance grise périaqueducule et le locus coeruleus) (Shughrue et al. 1997). Fait intéressant, le patron de distribution des récepteurs ne se chevauche pas complètement. Certaines régions expriment les deux sous-types alors que d'autres parties expriment seulement ou presque exclusivement un seul sous-type (Mitra et al. 2003, Laflamme et al. 1998). Les actions de l'estrogène semblent varier dépendamment des sous-types de récepteurs qui sont exprimés. Par conséquent, chacun des récepteurs semble associé à des fonctions différentes. ER- α semble être le récepteur qui est responsable des effets de l'estrogène au niveau de la reproduction, alors que ER- β est plus impliqué dans les fonctions non reproductives de l'estrogène. Il a été démontré que ER- β joue un rôle important dans l'anxiété (Imwalle et al. 2005), dans l'apprentissage spatial (Rissman et al. 2002) et la dépression (Rocha et al. 2005). En fait, les souris ne possédant pas le récepteur ER- β étaient plus anxieuses et présentaient des diminutions de 5-HT ou de dopamine dans plusieurs régions du cerveau (Imwalle et al. 2005). L'utilisation de souris transgéniques avec des délétions au niveau des gènes de ER- α et de ER- β ont permis une caractérisation sociosexuelle des différences au niveau du cerveau qu'il existe selon les sexes. Une approche comparable dans le domaine de la douleur serait très intéressante afin d'étudier les différences sexuelles qui existent dans ce domaine. L'estrogène a été démontré comme étant responsable des niveaux de nociception plus élevée chez les femelles comparativement aux mâles (Aloisi 2000, Aloisi & Ceccarelli 2000). De plus, il a été démontré que l'administration centrale d'estradiol pendant deux jours chez des rats mâles, augmente les comportements nociceptifs (Aloisi & Ceccarelli 2000). Ces

résultats vont à l'encontre de ce qui a été démontré chez l'humain, où des taux élevés en estrogène étaient associés à une augmentation du seuil de douleur (Riley, III et al. 1999). Les hypothèses pour expliquer ces différences pourraient être très nombreuses puisque ces deux modèles (humain et animal), tout comme les paramètres des études, divergent sur plusieurs points. Ces données nous indiquent que nous ne pouvons pas généraliser directement à l'humain, les résultats obtenus chez l'animal. Par contre, les animaux demeurent essentiels afin de mieux comprendre les mécanismes de perception et de modulation de la douleur et ultimement ces différences.

5.3 Progestérone

Malgré le fait que beaucoup moins d'études ont été réalisées avec la progestérone comparativement à l'estrogène, la progestérone semble impliquée dans la douleur. La progestérone possède seulement un type de récepteur nucléaire, les PR, sur lesquels elle agit. Ces récepteurs sont présents dans plusieurs régions du SNC telles que le noyau du tractus solitaire, la médulla ventrolatérale et le nucleus parabrachial (Kastrup et al. 1999). Sa localisation nous porte à croire que la progestérone serait impliquée dans la régulation autonome ainsi que dans les processus de transmission douloureuse. Des évidences suggèrent que la progestérone serait associée à des effets hyperalgésiques chez l'humain. En fait, une étude concernant la prise de progestérone a constaté que la progestérone pouvait induire des douleurs à l'abdomen, aux muscles, aux seins et à la tête chez des femmes saines (Matson et al. 1997). Des études réalisées chez les animaux ont aussi démontré des effets hyperalgésiques associés à la progestérone. L'administration de progestérone diminue le temps de latence lors du test de la plaque chaude et du tail-flick test (Kaur & Kulkarni 2002). Ces changements semblent associés au système sérotoninergique, puisqu'un agoniste sérotoninergique et un inhibiteur de la recapture de 5-HT sont capable de bloquer les effets algésiques de la progestérone (Kaur & Kulkarni 2002). De plus, à l'aide du modèle de constriction chronique du nerf sciatique, il a été démontré que le phénotype hypersensible des femelles intactes est reproduit chez des

femelles OVX suite à l'administration de progestérone (Lacroix-Fralish et al. 2006). Par ailleurs, un aspect très important des hormones sexuelles est l'interdépendance de la progestérone et de l'estrogène dans certains processus de douleur. Il est établi que la combinaison de ces 2 HS est essentielle dans certains mécanismes d'inhibition de la douleur (Gaumond et al. 2005). Par ailleurs, la concentration en estrogène semble moduler l'expression des récepteurs de la progestérone dans certaines régions du cerveau (MacLusky & McEwen 1978). Il est bien établi que l'estrogène peut augmenter l'expression des PR par le biais des ER lorsque les deux récepteurs sont exprimés sur les mêmes cellules (Temple & Wray 2005).

5.4 Testostérone

Le rôle de la testostérone dans la douleur commence à soulever de plus en plus d'intérêt. Cette hormone avait probablement été laissée de côté puisque la première hypothèse était que la prévalence féminine de certaines maladies de douleur chronique était préférentiellement associée à l'estrogène et la progestérone plutôt qu'à la testostérone. Par contre, le rôle protecteur de la testostérone dans certaines maladies a été suggéré pas seulement chez les hommes (Houghton et al. 2000), mais aussi chez les femmes (Kaergaard et al. 2000). De plus, des études autant chez l'humain (Cutolo 2000, Dessein et al. 1999, Navarro et al. 1998) que chez l'animal (Gaumond et al. 2005, Ceccarelli et al. 2003, Gaumond et al. 2002, Green & Dickenson 1997) ont suggéré un rôle protecteur de la testostérone au niveau de la douleur. Par ailleurs, des études animales supportent le rôle analgésique de la testostérone chez les deux sexes (Aloisi et al. 2004, Hau et al. 2004, Aloisi et al. 2003, Gaumond et al. 2002). La testostérone peut effectuer ses actions grâce à la liaison aux récepteurs des androgènes. Les AR sont distribués un peu partout dans le SNC incluant les régions impliquées dans la transmission et la modulation de la douleur (Craft et al. 2004, Aloisi 2003). D'un autre côté, plusieurs actions de la testostérone au niveau du SNC ne passent pas par les AR, mais sont plutôt médiées par les récepteurs de l'estrogène. En fait, la testostérone peut être aromatisée, sous

l'action d'enzymes aromatasas, en estrogène au niveau de différents tissus. Cet estrogène ainsi produit peut agir tel que mentionné précédemment, soit de façon génomique et non génomique au niveau des récepteurs à l'estrogène (Evrard & Balthazart 2004a, Evrard & Balthazart 2004b, Horvath & Wikler 1999).

Comme nous venons de le voir, l'implication des hormones sexuelles dans les processus de douleur a été clairement identifiée de plusieurs manières tant chez l'humain que chez l'animal, mais les rôles précis de chacun des récepteurs des hormones sexuelles dans les mécanismes de modulation de la douleur demeurent incertains. L'interaction entre les hormones sexuelles, leurs récepteurs et certains neurotransmetteurs impliqués dans la modulation des processus de douleur tels que la sérotonine, la noradrénaline, les opioïdes et le GABA semble différente selon le sexe. Ces divergences pourraient être à l'origine des différences qui existent entre les hommes et les femmes dans la perception ainsi que dans l'inhibition de la douleur. Nous allons maintenant examiner en profondeur ces neurotransmetteurs particuliers qui jouent des rôles importants dans la perception et l'intégration de la douleur, afin de mieux comprendre la relation qui existe avec les hormones sexuelles.

6. Neurotransmetteurs impliqués dans la modulation de la douleur

Dans cette section, seulement les principaux neurotransmetteurs ayant des rôles en lien étroit avec les hormones sexuelles et les systèmes d'inhibition étudiés lors de ma maîtrise seront détaillés.

6.1 Sérotonine et Noradrénaline

La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur monoaminergique obtenu suite à des modifications enzymatiques de l'acide aminé tryptophane. L'enzyme tryptophane hydroxylase contrôle l'étape limitante dans le processus de production de 5-HT. Ce neurotransmetteur est impliqué dans la plupart des comportements, dans la régulation thermique, le sommeil, la prise alimentaire, l'anxiété et la perception sensorielle. La

5-HT est présente au niveau du système nerveux central et périphérique, des muqueuses intestinales, du foie, de la peau et de la rate. La 5-HT peut se lier à différents sous-types de récepteurs pour effectuer ses différentes actions. Il y a la famille des récepteurs 5-HT₁ (a-f), la famille des 5-HT₂ (a-c), 5-HT₃ et 5-HT₄. Ce sont majoritairement des récepteurs couplés à des protéines G et leur activation peut enclencher différentes cascades intracellulaires.

La noradrénaline (NA), pour sa part, fait partie de la famille des catécholamines. Elle est obtenue à partir de la tyrosine suite à des modifications enzymatiques. L'étape limitante est la première du processus et elle est médiée par la tyrosine hydroxylase. Les neurones adrénergiques sont principalement regroupés en trois régions au niveau du SNC; les complexes du locus coeruleus, le système tegmental latéral et le groupe dorsal médullaire. Ces régions font des projections synaptiques avec plusieurs autres endroits. Des cellules noradrénergiques sont aussi présentes en périphérie au niveau des ganglions sympathiques et de la médulla de la glande surrénale. La NA peut agir sur deux principaux sous-types de récepteurs adrénergiques, soit les α (α_1 et α_2) et les β (β_1 , β_2 et β_3). L'activation de ces récepteurs modifie les concentrations en calcium via différentes voies de signalisation. Les différents sous-types de récepteurs peuvent induire des effets opposés.

Ainsi, la 5-HT et la NA sont deux neurotransmetteurs impliqués de façon très importante dans les processus de nociception. Des études ont démontré que les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques expriment les récepteurs de l'estrogène et de la progestérone (Haywood et al. 1999, Simonian & Herbison 1997) et que ces deux hormones sexuelles peuvent altérer l'expression de la 5-HT et NA dans les neurones du NRM et du LC (Schutzer & Bethea 1997). Ces régions, telles que mentionnées précédemment, sont particulièrement impliquées dans la mise en place d'un mécanisme d'inhibition, le CIDN (Le Bars et al. 1979b). Par ailleurs, certaines études effectuées lors du test à la formaline se sont intéressées aux rôles de ces neurotransmetteurs. En fait, il a été démontré que la castration produit une

augmentation des réponses nociceptives lors de ce test (Gaumond et al. 2002) et une réduction de plusieurs neurotransmetteurs, dont la 5-HT et NA (Das & Chaudhuri 1995). Par ailleurs, en 1998, Omote et ses collègues ont effectué des administrations intrathécale de yohimbine (antagoniste adrénergique) et de methysergide (antagoniste sérotoninergique) lors du test à la formaline, et ce, dans le but de vérifier l'implication des systèmes inhibiteurs monoaminergiques. Ils ont découvert que les deux composés induisent une augmentation des comportements nociceptifs au niveau de toutes les phases du test à la formaline. Par conséquent, ils sont arrivés à la conclusion que des systèmes inhibiteurs descendants impliquant la NA et la 5-HT sont activés lors de ce test (Omote et al. 1998).

6.2 Opioïdes

Le terme opioïdes désigne toute substance, endogène ou synthétique, qui produit des effets similaires à la morphine et qui sont bloqués par un antagoniste (naloxone). Les opioïdes sont utilisés depuis très longtemps et demeurent encore aujourd'hui les médicaments les plus efficaces pour soulager les douleurs de modérées à sévères (Chauvin & Beaulieu 2005). Par contre, leur utilisation peut provoquer de la tolérance, de la dépendance et amener plusieurs effets secondaires non négligeables sur d'autres systèmes tels que le système respiratoire, cardiovasculaire, gastro-intestinal, pour ne nommer que ceux-ci. Pour le moment, aucun composé n'est parfait. Des molécules aux effets analgésiques très similaires peuvent être produites par le corps de façon endogène, suite à différentes situations telles que la douleur, le plaisir et le stress (Wiesenfeld-Hallin 2005). Il existe trois principaux peptides opioïdiques : l'enképhaline, la β -endorphine et les dynorphines. Ces peptides proviennent de gènes différents et agissent sur les récepteurs aux opioïdes : mu, kappa et delta. L'affinité des différents peptides opioïdiques varie pour chacun des sous-types de récepteur (tableau 1). Chacun des effets biologiques des opioïdes dépend de l'activation d'un sous-type de récepteur particulier ou de l'activation d'une combinaison de récepteurs prédéterminée. L'analgésie supraspinale est

majoritairement médiée par les récepteurs mu, alors que les trois sous-types ont à peu près la même implication dans l'analgésie spinale. De plus, dans plusieurs systèmes, l'activation du récepteur mu et du récepteur kappa induit des effets opposés (Pan 1998). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G de type $G\alpha_{i/o}$. La liaison des opioïdes peut, par différents moyens tels que l'inhibition de l'adénylate cyclase, l'ouverture des canaux potassiques ou bien l'inhibition de l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage, créer une réduction de l'excitabilité cellulaire menant à une inhibition. Il existe un quatrième récepteur des opioïdes, dénommé ORL1 pour Opioid Receptor Like type 1. Aucun des agonistes opioïdes classiques ne se lie à ce récepteur (Mollereau et al. 1994). Par contre, un neuropeptide appelé nociceptine, ayant des effets controversés sur la nociception, réussit à se lier à ce nouveau récepteur. En effet, cette substance produirait de façon générale des effets inhibiteurs. Par contre, dépendamment du système neuronal sur lequel ce neuropeptide agit, il produit de l'analgésie (Reinscheid et al. 1995) ou bien de l'hyperalgésie (Meunier et al. 1995).

Tableau 1 : Affinités des peptides opioïdergiques endogènes pour les différents sous-types de récepteurs aux opioïdes.

Peptides endogènes	Mu	Delta	Kappa
β -endorphines	+++	+++	+++
Enképhalines	++	+++	-
Dynorphines	++	+	+++

+++ = très grande affinité, ++ = affinité moyenne, + = affinité faible et - = aucune affinité

Source : Adapté de Chauvin M, Beaulieu P. 2005. Pharmacologie des opioïdes. In Pharmacologie de la douleur, ed. P Beaulieu, 2:39-77. Les presses de l'Université de Montréal.

Un dimorphisme sexuel existe au niveau des systèmes opioïdergiques (Hammer 1985, Hammer 1984). En fait, la distribution et le nombre de chaque sous-type de

récepteurs aux opioïdes au niveau du SNC ne sont pas les mêmes entre les mâles et les femelles. Les HS semblent jouer un rôle dans ces différences puisque les HS sont capables de modifier plusieurs paramètres de ces systèmes. Un traitement à l'estradiol permet d'augmenter le nombre de récepteurs mu au niveau du thalamus et de l'hippocampe (Dondi et al. 1992). D'un autre côté, l'estradiol cause l'internalisation des récepteurs mu à d'autres endroits du SNC (Aloisi et al. 2002, Eckersell et al. 1998) et par conséquent peut diminuer les effets analgésiques médiés par ce récepteur à certains endroits (Kelly et al. 2002). La progestérone semble s'opposer aux effets de l'estrogène, puisqu'elle augmente les ARNm des récepteurs mu. Par ailleurs, les HS peuvent aussi agir au niveau des peptides opioïdiques. L'estrogène peut augmenter l'ARNm des enképhalines, favorisant ainsi leurs productions (Sinchak et al. 2000, Holtzman et al. 1997). Par contre, l'estrogène diminue l'expression du gène *POMC* qui est le gène qui code pour les endorphines. Cette action de l'estrogène induit par conséquent une diminution de la production d'endorphines (Desjardins et al. 1995). Encore une fois, les autres HS contrebalancent cet effet. La testostérone a l'effet contraire sur la production d'endorphines et l'administration de progestérone amoindrit les effets de l'estrogène sur cette diminution d'endorphines. Ces effets complémentaires démontrent bien la complexité des effets des hormones sexuelles sur la douleur.

Tels que mentionnés précédemment, les seuils de tolérance à la douleur sont plus élevés lors de la grossesse. Cette augmentation est causée par la mise en place de mécanismes d'analgésie qui impliquent les opiacés (Dawson-Basoa & Gintzler 1997, Dawson-Basoa & Gintzler 1996, Marcus 1995). Des études effectuées chez le rat ont permis de démontrer que l'analgésie lors de la gestation dépendait de deux systèmes opioïdiques spinaux qui sont silencieux en condition normale (Dawson-Basoa & Gintzler 1997, Dawson-Basoa & Gintzler 1996). Par ailleurs, il a été démontré, à l'aide de supplémentations hormonales, aussi bien chez des mâles que des femelles, que le profil hormonal de la gestation est responsable de cette analgésie. Fait intéressant, les systèmes opioïdiques ne sont pas les mêmes chez les femelles que

chez les mâles suite aux suppléments hormonales, les systèmes spinaux recrutent les récepteurs kappa et les récepteurs mu chez les mâles, alors que c'est les kappa et les delta qui sont activés chez les femelles (Liu & Gintzler 2000).

Une étude forte intéressante a été effectuée avec des souris déficientes pour les différents sous-types de récepteurs aux opioïdes, afin de vérifier leurs implications dans divers processus de douleur (Martin et al. 2003). Toutes les modifications observées dans cette étude consistaient en une augmentation de la réponse nociceptive, suggérant un rôle soutenu du système opioïdérique endogène dans l'inhibition de la perception de douleur. Cependant, ce ne sont pas les mêmes sous-types de récepteurs qui sont impliqués dépendamment du type de stimulation appliquée. Le récepteur kappa semble important chez les femelles lors du test d'immersion de la queue, puisqu'en son absence, les souris perçoivent la douleur plus rapidement. Chez les mâles, lors du test de la plaque chaude, le récepteur mu est responsable d'une diminution du temps de latence. Par contre, chez les femelles, aucun des mutants (mu, kappa, delta) ne démontre de modification des réponses nociceptive lors du test de la plaque chaude. En revanche, lorsqu'un mutant pour les trois sous-types de récepteurs aux opioïdes est testé, une diminution importante du temps de latence est observée pour ce test. Par conséquent, les souris mutantes pour les trois sous-type de récepteurs semblent percevoir la douleur plus rapidement, puisqu'elles réagissent à la chaleur beaucoup plus rapidement que les souris normales lorsqu'elles sont déposées sur la plaque chaude (Martin et al. 2003). Ces données suggèrent que l'analgésie n'est pas médiée via un seul sous-type de récepteur, mais qu'une combinaison de sous-types de récepteurs est nécessaire pour obtenir l'analgésie. Par ailleurs, ce groupe a aussi testé ces animaux mutants au niveau du test à la formaline. Ils ont trouvé que le récepteur mu était important en phase 1 et le récepteur delta en phase 2 chez les femelles. Aucune différence significative n'a été observée chez les mâles (Martin et al. 2003). Aucune de ces études ne s'est intéressée au rôle spécifique des récepteurs aux opioïdes au niveau de l'interphase lors de leurs analyses.

6.3 GABA

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur très présent au niveau du SNC. Il est principalement associé à des fonctions inhibitrices et médie ses effets via deux principaux récepteurs; GABA_A et GABA_B. Le récepteur GABA_A est celui qui a suscité le plus d'intérêt, puisqu'il possède un site de liaison pour les neurostéroïdes. Les neurostéroïdes tels que la progestérone, la testostérone, le déoxycorticostérone et leurs métabolites peuvent se lier et moduler la fréquence et la durée d'ouverture du canal de la même façon que la liaison des barbituriques et des benzodiazépines peuvent le faire (Zinder & Dar 1999). Ils peuvent ainsi potentialiser les effets du GABA tels que l'anticonvulsion, la sédation, la diminution de l'anxiété et l'analgésie. Une étude a démontré qu'un stress intense ou bien un choc au niveau de la patte induit une augmentation importante des métabolites de la progestérone. Ces métabolites produisent une inhibition de la douleur en se liaient au récepteur GABA_A (Barbaccia et al. 1996). Étant donné que la douleur est un stress pour l'organisme, il serait fort probable que les neurostéroïdes puissent avoir un certain rôle sur le GABA dans des mécanismes d'inhibition de la douleur. Certains médicaments gabaergique sont parfois utilisés pour traiter des douleurs, particulièrement celles avec une composantes neurogénique. L'utilisation d'agoniste et d'antagoniste du récepteur GABA_A a été à l'origine de plusieurs études au niveau du test à la formaline. Plusieurs d'entre elles ont mené à des conclusions allant de légèrement à complètement différentes et plusieurs ne se sont pas intéressé à l'interphase. Parmi les études qui ont analysé l'interphase, il y en a une qui a démontré que des substances, telles que le pentobarbital, le diazépam et l'alcool bloquaient les mécanismes d'inhibition présents au niveau de l'interphase du test à la formaline (Abbott, 1993). Ces composés ont un effet agoniste sur le récepteur GABA_A, par conséquent une analgésie plutôt qu'un blocage de l'analgésie serait attendue. Par contre, chacun de ces composés agit sur un autre système ce qui pourrait expliquer qu'aucune autre étude n'a obtenu des résultats similaires par la suite. Une autre étude utilisant des agonistes démontre une diminution de la nociception au niveau de toutes les phases du test à la formaline (Kaneko & Hammond 1997). Par contre, ils ont utilisé la

bicuculline à des doses supraphysiologiques telles que 50 µg chez des animaux spinalisés. Par conséquent, les comportements nociceptifs n'ont pu être observés suite au test à la formaline, mais ces comportements nociceptifs ont plutôt été déduits grâce aux enregistrements électrophysiologiques des neurones nociceptifs spinaux. Ils sont arrivés à la conclusion que la bicuculline bloquait complètement l'interphase et augmentait la nociception en phase 2 chez des mâles (Green & Dickenson 1997). Une autre étude a été faite avec de la bicuculline, à des doses très faibles (0.3 µg), les auteurs ont noté une légère augmentation de la nociception en interphase et phase 2 (Kaneko & Hammond 1997). Par conséquent, nous avons jugé intéressant de vérifier l'implication du GABA dans les mécanismes d'inhibition, en essayant de bloquer, d'un point de vue comportemental, l'interphase grâce à l'utilisation des doses supérieures à 0.3 µg, mais beaucoup plus faibles que 50 µg. De plus, aucune étude ne s'est intéressée aux femelles, seulement des mâles ont été testés. Il sera donc très intéressant de vérifier si les mécanismes gabaergiques sont différents selon le sexe.

7. Modèles animaux

Il est évident que les résultats obtenus chez l'animal ne peuvent être généralisés directement à l'humain. Par contre, ces modèles présentent plusieurs avantages. Les animaux sont des modèles très pertinents puisqu'ils nous permettent de reproduire certaines douleurs qui s'apparentent aux douleurs présentes chez les humains. Par ailleurs, il est possible d'injecter différentes substances, tel que des antagonistes de façon à vérifier l'implication de certaines molécules dans ces mécanismes de douleur. Nous pouvons aussi étudier les rôles des hormones sexuelles (HS) grâce à des modifications des niveaux hormonaux (gonadectomie, supplémentation) ou bien l'implication de leurs récepteurs en utilisant des animaux ayant subi des modifications génétiques. Ces expérimentations sont nécessaires afin de bien caractériser certains mécanismes d'action encore incompris, par conséquent les modèles animaux prennent toute leur importance.

Chez l'animal, le terme « réponse nociceptive » est beaucoup plus approprié puisque la sensation de douleur ressentie ne peut être verbalisée par ce dernier. La nociception fait référence à l'activité chimioélectrique provenant des nocicepteurs et voyageant par les fibres nerveuses lors d'une stimulation potentiellement dangereuse pour l'organisme (IASP 1982, IASP 1979). L'évaluation de la douleur chez l'animal se fait donc de façon indirecte par l'observation des comportements nociceptifs suite à différentes stimulations nociceptives. Ces observations sont ensuite interprétées comme étant des signes de douleur.

7.1 Stimulations nociceptives

Les stimulations nociceptives sont divisées en différentes catégories dépendamment de leur nature (chimique, mécanique, thermique) ainsi que selon leur durée (aiguë, tonique, chronique). Ces catégories permettent d'étudier divers processus liés à la nociception. La douleur aiguë est une douleur de courte durée qui peut être étudiée de nombreuses façons. L'application de différents stimulus telle qu'une source de chaleur (douleur thermique telle que le test de la plaque chaude) ou une pression au niveau de la patte de l'animal peut être effectuée. L'analyse comportementale, comme le temps de retrait de la patte, nous indique ainsi le niveau de nociception. Moins une stimulation est douloureuse pour l'animal plus son temps de réaction pour retirer sa patte sera long. Par ailleurs, l'injection de certaines substances telles que la formaline (douleur chimique) induit de façon très rapide des comportements douloureux qui peuvent être analysés selon des critères prédéterminés. Le test à la formaline est très intéressant puisqu'il induit des réponses nociceptives caractéristiques permettant d'étudier lors d'un même test, des réponses nociceptives de types aigus et toniques, classiquement étudié comme une réponse biphasique (phase 1 et 2). De plus, entre ces deux phases, une période d'inhibition active, l'interphase, a été identifiée (Gaumond et al. 2002, Henry et al. 1999). Ce test, très utilisé lors de ma maîtrise, sera maintenant détaillé.

7.2 Test à la formaline

Le test à la formaline est un test de nociception triphasique qui est très intéressant puisqu'il permet d'étudier trois phénomènes de nociception à la fois. Suite à l'injection en sous-cutané de formaldéhyde dans la patte arrière de l'animal, différents phénomènes de nociception caractérisent chacune des phases de ce test (Tjolsen et al. 1992, Dubuisson & Dennis 1977). Tout d'abord, la phase 1 correspond à l'activation des nocicepteurs suite à l'injection. Cette phase de douleur aiguë est présente durant les 9 premières minutes du test et est caractérisée par une augmentation très rapide des réponses nociceptives. Par la suite, le niveau de nociception diminue de façon très importante entre les minutes 9 et 18. Cette phase, nommée interphase, a longtemps été considérée comme une phase d'inactivité entre la phase 1 et la phase 2. Par contre, il est maintenant bien établi que cette phase représente un mécanisme d'inhibition actif de la douleur (Gaumond et al. 2002, Henry et al. 1999, Omote et al. 1998, Matthies & Franklin 1992). La prochaine section traitera en détail de l'interphase. Suite à l'interphase, les comportements nociceptifs augmentent de nouveau, c'est la phase 2. Cette phase correspond à de la nociception induite par l'inflammation ou même d'une sensibilisation centrale (Tjolsen et al. 1992, Dubuisson & Dennis 1977). Cette douleur diminue lentement avec le temps et représentant un processus de nociception tonique, c'est-à-dire soutenue dans le temps. Des doses très variables de formaline (0.5-10%) peuvent être utilisées pour effectuer ce test. Il a été démontré, grâce à l'utilisation de doses allant de 0.25% à 5%, que la formaline produit une réponse qui est dose-dépendante. Par ailleurs, dépendamment des doses utilisées, les mécanismes présents ne sont pas les mêmes. En fait, les mécanismes neurogéniques sont prédominants à des faibles doses de formaline (< 2.5%) alors que les mécanismes présents sont de nature neurogénique et inflammatoire à des doses plus élevées (3.75-5%). Afin de se concentrer particulièrement sur les mécanismes neurogéniques, la dose de 2% a été choisie pour nos études.

7.2.1 Mécanismes d'inhibition de la douleur

Matthies et Franklin ont été les premiers en 1992 à émettre l'hypothèse que l'interphase est un phénomène actif d'inhibition de la douleur. En fait, en voulant effectuer des études sur l'effet analgésique de la morphine sur les centres supérieurs, ils ont découvert que les rats décérébrés avaient les mêmes comportements nociceptifs que les rats sains lors du test à la formaline, à une exception près : l'interphase n'existait plus chez les rats décérébrés (Matthies et Franklin, 1992). Ils sont donc arrivés à la conclusion que cette phase correspondait à un mécanisme de modulation de la douleur provenant des centres supérieurs. Par la suite, une étude démontra par une seconde injection de formaldéhyde que l'interphase est bel et bien un mécanisme d'inhibition actif de la douleur (Henry, 1999). En fait, Henry effectua une deuxième injection de formaldéhyde 20 minutes après le début du test à la formaline, c'est-à-dire au début de la phase 2. Si l'interphase avait réellement été une phase d'inactivité, le niveau de nociception n'aurait pas été modifié en phase 2 par la seconde injection, cependant, il observa une diminution de la douleur suite à cette deuxième injection. Henry arriva à une conclusion contradictoire de celle de Matthies et Franklin concernant l'emplacement de ce mécanisme. Henry conclut que ce mécanisme est présent au niveau spinal puisqu'un animal spinalisé continue de présenter une réponse biphasique au test à la formaline. Ces données portent donc à croire qu'il existe plus d'un mécanisme inhibiteur responsable de l'interphase. Par ailleurs, des différences importantes sont présentes entre les femelles et les mâles au niveau du test à la formaline et les hormones sexuelles en sont la cause (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Nous verrons en détail comment les hormones peuvent moduler les différentes phases du test à la formaline.

7.2.2 Rôles des hormones sexuelles sur le test à la formaline

Des études effectuées dans nos laboratoires ont permis de démontrer que les différentes phases du test à la formaline sont modulées de façon distincte par les hormones sexuelles (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Premièrement, la

comparaison d'animaux intacts des deux sexes a permis de démontrer que les femelles ont plus de comportements nociceptifs que les mâles aux niveaux de toutes les phases du test à la formaline (voir figure 7a). Dans un deuxième temps, ces différences disparaissent complètement lorsque la comparaison est faite entre des animaux gonadectomisés des deux sexes (figure 7b) démontrant ainsi un rôle modulateur des hormones sexuelles sur le test à la formaline. Par la suite, des comparaisons entre les animaux intacts et les animaux gonadectomisés ont permis de déterminer spécifiquement à quel endroit chaque hormone agit. En fait, en comparant les deux groupes de mâles entre eux, on remarque qu'il n'y a pas de différence dans le niveau de nociception en interphase alors qu'en phases 1 et 2, les mâles castrés présentent des niveaux de nociception plus élevés que les mâles intacts (figure 7c). Ces données suggèrent que la testostérone n'est pas impliquée dans l'interphase alors qu'elle semble avoir un rôle protecteur contre la douleur dans les phases actives 1 et 2 du test à la formaline. D'un autre côté, en s'intéressant à la comparaison des groupes de femelles, on constate que la seule différence qu'il y a se retrouve en interphase. Les femelles ovariectomisées ont des niveaux de nociception plus faibles en interphase que les femelles intactes. Ces données portent à croire que l'estrogène et la progestérone diminuent l'efficacité ou le recrutement des mécanismes d'inhibition de la douleur présents pendant cette phase (Gaumond et al. 2005). Par la suite, diverses supplémentations ont permis de confirmer les différents rôles des hormones sexuelles au niveau du test à la formaline. L'administration de testostérone chez des mâles castrés permet de retrouver exactement la même courbe que présentent les mâles intacts. Par contre, chez les femelles ovariectomisées, il a été démontré que l'estrogène et la progestérone doivent être administrées de façon concomitante pour obtenir une courbe similaire aux femelles intactes. Lorsque l'estrogène ou bien la progestérone est administré seul, aucune modification significative des comportements nociceptifs en interphase n'est observée par rapport aux femelles ovariectomisées. Il semble que la combinaison de ces deux hormones soit essentielle afin de moduler cette phase (Gaumond et al. 2005).

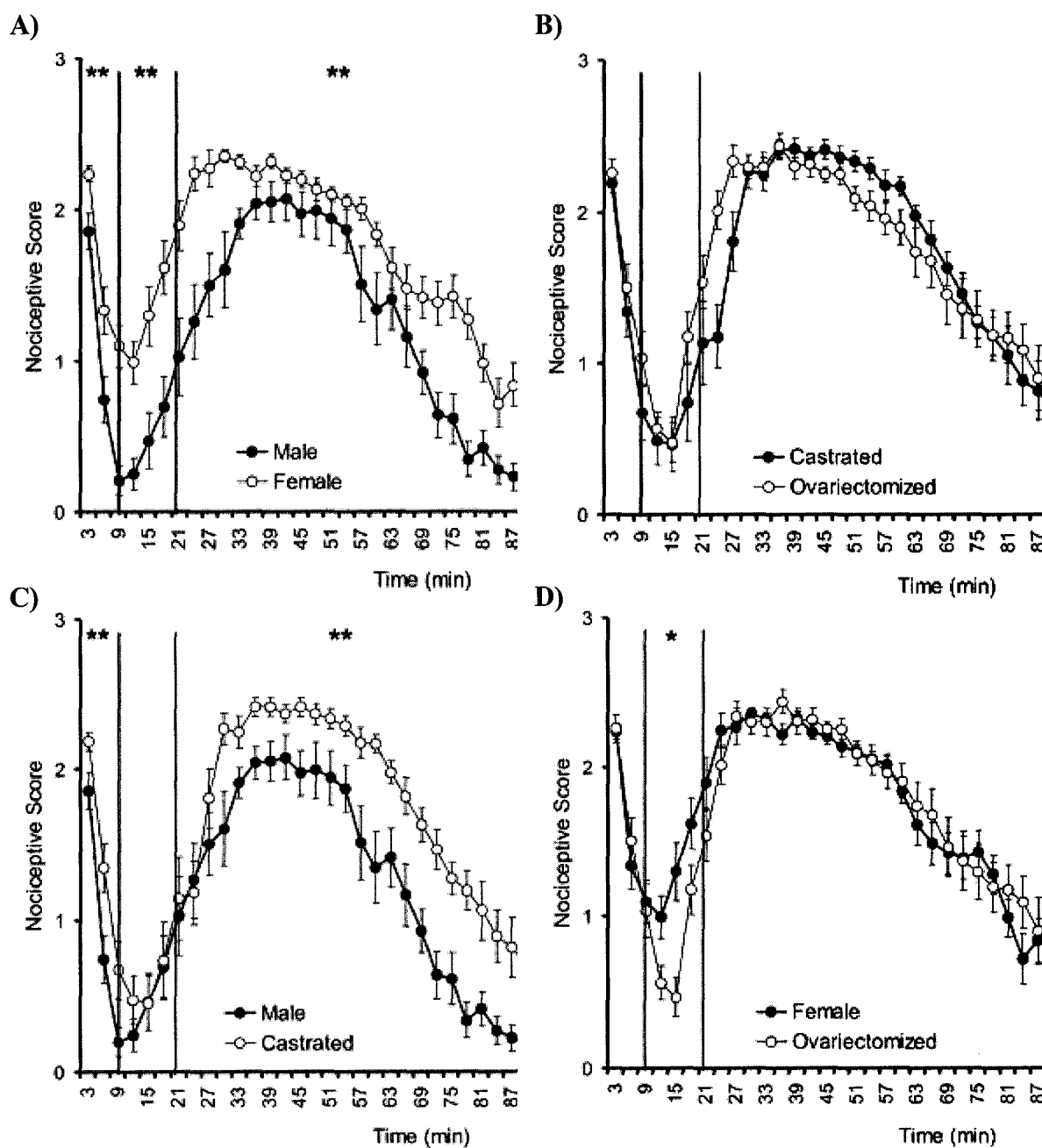


Figure 7: Effets des hormones sexuelles sur le test à la formaline

Tests à la formaline effectués chez des animaux intacts des deux sexes, B) chez des animaux gonadectomisés. C) Comparaison des résultats obtenus chez les mâles intacts et les mâles castrés. D) Comparaison des résultats obtenus chez les femelles intacts et les femelles ovariectomisées. Graphiques tirés de Gaumond et al. 2002.

7.2.3 Quantification de la douleur

L'analyse des comportements nociceptifs lors du test à la formaline peut s'effectuer selon différentes méthodes. La méthode de Dubuisson et Dennis (1977) est basée sur l'assignation d'un chiffre aux différents comportements douloureux présents lors du test à la formaline. Dépendamment des comportements de l'animal, un chiffre allant de 0 à 3 lui est assigné (0 = la patte injectée demeure complètement au sol; 1 = la patte injectée demeure au sol sans pression sur celle-ci; 2 = la patte injectée est soulevée; 3 = la patte injectée est léchée ou mordillée). Suite à la période d'observation, une moyenne du temps passé à effectuer chacun de ces comportements pour des périodes de 3 min est effectuée pour obtenir une courbe. Il est aussi possible de quantifier le nombre de temps que l'animal a passé à secouer, lécher ou mordre sa patte injectée pour les différentes phases du test à la formaline (Tjolsen et al. 1992). Nous avons choisi la méthode de Dubuisson pour effectuer l'analyse des résultats puisqu'elle a été démontrée comme étant la meilleure méthode pour détecter des différences de douleur (Abbott et al. 1995). Par contre, la méthode décrite par Tjolsen présente des caractéristiques intéressantes puisqu'elle permet de distinguer les comportements spinaux par rapport aux comportements supraspinaux. Par conséquent, la combinaison de ces deux méthodes d'analyse peut se révéler très utile.

Objectifs de l'étude

Mon projet de maîtrise a été divisé en deux principaux projets :

- 1- Déterminer le rôle des opioïdes et du GABA dans les mécanismes d'inhibition de la nociception présents au niveau de l'interphase du test à la formaline chez des rats, tout en établissant le lien avec les hormones sexuelles.

Des études antérieures dans nos laboratoires sont à l'origine de ce premier projet. Ces études ont permis de déterminer que les mécanismes d'inhibition de la douleur au niveau de l'interphase du test à la formaline semblent différents selon le sexe (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Ces données ont soulevé plusieurs interrogations auxquelles nous avons tenté de répondre durant ma maîtrise, telles que:

- Est-ce que les opioïdes sont impliqués dans l'inhibition de l'interphase du test à la formaline ?
- Est-ce que les hormones sexuelles modulent le recrutement des mécanismes d'inhibition opioïdergiques?
- Quel sous-type de récepteurs aux opioïdes (μ , κ , δ) est impliqué dans ce mécanisme d'inhibition opioïdergique?
- À quel niveau ce mécanisme d'inhibition est-il recruté (périphérie, spinale, supraspinale)?
- Est-ce que le GABA est impliqué dans cette inhibition ?

- 2- Évaluer le rôle du récepteur bêta de l'estrogène dans les processus de nociception aiguë et tonique, ainsi que dans les mécanismes d'inhibition de la nociception chez des souris des deux sexes en relation avec l'expression de c-Fos au niveau spinal.

Méthodes

Toutes les expériences qui sont mentionnées ci-dessous, impliquant des animaux, ont été approuvées préalablement par le comité éthique de l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke.

8. Animaux

8.1 Rats Sprague-Dawley

Des rats Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Québec), des deux sexes ayant subi ou non des gonadectomies, ont été utilisés lors du test à la formaline. Ce test de douleur tonique a été réalisé en présence de différents antagonistes, afin de vérifier le rôle des opioïdes et du GABA dans le mécanisme d'inhibition de l'interphase en lien avec les hormones sexuelles (n= 6-8 rats/ groupe). Les rats Sprague-Dawley de trois mois d'âge lors des tests à la formaline étaient gardés 4 par cage (même sexe, même condition hormonale) sous des cycles de lumière de 12 heures. La température et l'humidité étaient gardées constantes (21 ± 1 °C, 55 %). L'eau et la nourriture étaient disponibles *ad libitum*. Les rats ont été acclimatés aux manipulations et aux cages à la formaline au moins trois fois dans la semaine qui précédait les expérimentations pour éviter que les rats soient stressés lors des tests de douleur. Les gonadectomies ont été effectuées par la compagnie Charles River un mois après la naissance. Une période de deux mois séparait les expérimentations ce qui permettait aux animaux de bien se rétablir suite à l'opération et d'éliminer toutes les hormones sexuelles accumulées dans les graisses.

8.2 Souris C57BL/6

Des souris C57BL/6 déficientes pour le récepteur bêta de l'estrogène ($ER-\beta^{-/-}$) et de type sauvage ($ER-\beta^{+/+}$) de 4 mois d'âge lors des expériences ont été utilisées. Des souris hétérozygotes pour le gène du récepteur bêta de l'estrogène ($ER-\beta^{+/-}$, souris

généreusement fournies par Pr. Pierre Chambon, Strasbourg) ont été croisées par Dre Julie Carrier, afin d'obtenir des souris ayant les différents génotypes qui nous intéressaient. Un génotypage a ensuite été effectué par réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour déterminer quelles souris étaient ER- $\beta^{-/-}$ et celles qui étaient ER- $\beta^{+/+}$. Des ovariectomies ont été effectuées par Dre Carrier six semaines après la naissance selon les méthodes standards de chirurgie. Cette procédure était nécessaire puisque les souris déficientes pour le récepteur ER- β n'ont pas une fonction ovarienne complètement normale. Par conséquent, pour éviter toutes variations hormonales, les deux groupes de femelles ont été ovariectomisées et supplémentées en estrogène et progestérone afin que toutes modifications au niveau des tests de douleur soient seulement attribuables au récepteur et non au changement en hormones sexuelles. Suite à la chirurgie, des capelets à relâchement continu sur 90 jours, contenant 0.5 mg de 17 β -estradiol et 10 mg de progestérone, ont été implantés en sous-cutané au niveau du cou. Les animaux étaient gardés dans les mêmes conditions que les rats, tel que mentionné précédemment.

9. Tests de nociception

9.1 Test de la plaque chaude

Les souris étaient placées sur une plaque chaude entourée d'une cage en plexiglas maintenue à 47,2 °C pendant une période de 4 minutes. Le nombre de fois que l'animal léchait ses pattes arrière a été noté de façon manuelle pour chacun des groupes.

9.2 Test à la formaline

Une solution de formaldéhyde 2% (15 μ l pour les souris et 50 μ l pour les rats) a été injectée en sous-cutanée dans la patte arrière droite de l'animal. Immédiatement après l'injection, l'animal était placé dans une cage en plexiglas entouré de miroirs pour permettre l'observation des comportements nociceptifs. Deux animaux étaient

observés en même temps pendant une période d'une heure et les comportements étaient notés grâce à un programme informatique d'analyse développé dans nos laboratoires (Gaumond, 2002). Ce programme permet de déterminer le temps passé dans chaque comportement douloureux tel que décrit précédemment par Dubuisson et Dennis (1977).

0 = La patte injectée demeure complètement au sol

1 = La patte injectée demeure au sol sans pression sur celle-ci

2 = La patte injectée est soulevée

3 = La patte injectée est léchée ou mordillée

Ce test était toujours effectué entre 9h et 11h pour éviter les variations dues aux rythmes circadiens. Les réponses nociceptives du test à la formaline ont été divisées en trois phases en fonction du temps; phase 1 = 0-6 min, interphase = 9-18 min, phase 2 = 21-60 min (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002).

9.2.1 Composés administrés

Des antagonistes opioïdiques et gabaergiques ont été administrés à différents groupes de rats par voie intrapéritonéale ou intrathécale, avant d'effectuer les tests à la formaline. La période de temps entre l'injection et l'expérimentation varie en fonction de la capacité des différentes drogues à se distribuer et de leur demi-vie (tableau 2). Le composé 1 a été administré à des rats gonadectomisés des deux sexes, les composés 2, 3, 4, 5 et 6 ont été seulement utilisés chez des femelles intactes (non-gonadectomisées), alors que la bicuculline a été injectée à des mâles et des femelles intacts.

Les injections i.t. sont faites entre les vertèbres lombaires 4 et 5 de la moelle épinière, puisque c'est à cet endroit que les informations nociceptives de la plante de la patte sont envoyées. Ces injections sont effectuées sous anesthésie à l'isoflurane 3 %. Les animaux se réveillent presque immédiatement après l'injection et une période de quelques minutes est suffisante pour leur permettre de retrouver toutes leurs

capacités. Les animaux contrôles ont subi toutes les mêmes procédures que les groupes expérimentaux, par contre les solutions d'injection contenaient seulement le véhicule, c'est-à-dire de la saline.

Tableau 2: Antagonistes utilisés lors des tests à la formaline chez les rats

Composés	Spécificité	Administration	Doses (mg/kg)	Attente*
1-Naloxone HCL	$\mu > \kappa > \delta$ partout	i.p.	0.5, 1, 2, 5, 10	5 min
2-Naloxone HCL	$\mu > \kappa > \delta$ spinaux	i.t.	0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1	10 min
3-Naloxone méthiodide	$\mu > \kappa > \delta$ périphériques	i.p.	10	5 min
4-Naltrindole	δ	i.p.	10	15 min
5-Naltrexone	μ	i.p.	10	15 min
6-Nor-BNI	κ	i.p.	10	18 h
7-Bicuculline	GABA _A	i.t.	2 μ g	15 min

* Temps d'attente avant d'effectuer le test à la formaline suite à l'injection du composé

9.2.2 Récupération des tissus

Suite au test à la formaline, les animaux sont endormis à l'aide d'une solution de kétamine/xylazine (0.1 ml/souris et 0.4 ml/rat) dans le but de faire une perfusion intracardiaque. Tout d'abord, la cage thoracique de l'animal est ouverte, le cœur est dégagé, une aiguille est insérée au niveau de l'apex du cœur et fixée de façon à ce que la pointe de l'aiguille se retrouve à la base de l'aorte. Le ventricule droit est coupé et la pompe à perfusion est actionnée pour faire circuler une solution tampon de PBS dans le corps entier, dans un premier temps, et ensuite une solution de formaldéhyde 4 % pour fixer les tissus. Une dissection est effectuée, chaque vertèbre ainsi que les

os du crâne sont délicatement retirés à l'aide de pince à dissection pour prélever les tissus du système nerveux (moelle épinière et cerveau). Les tissus sont placés dans le formaldéhyde 4 % pendant toute une nuit et sont ensuite transférés dans une solution de sucrose à 30 % pour les cryoprotéger et les conserver jusqu'à leurs utilisations pour les analyses immunohistochimiques.

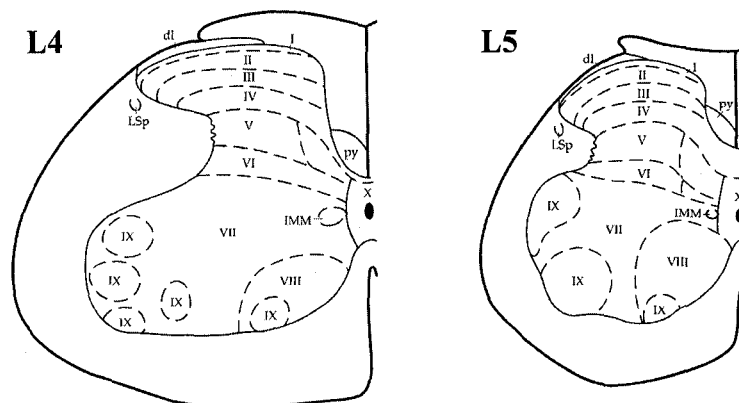
10. Immunohistochimie du c-Fos

Les sections de moelle correspondant aux lombaires 4 et 5 ont été tout d'abord gelées, coupées à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 40 micromètres et placée dans une solution de PBS et de peroxyde d'hydrogène 0.3 % pendant une heure. Suite à trois lavages au PBS, les sites non spécifiques ont été bloqués grâce à une incubation d'une heure dans une solution à base de PBS contenant du Triton-X-100 0.3% et du sérum normal de chèvre (NGS) 3%. D'autres lavages ont été effectués avant d'incuber durant toute la nuit les coupes avec l'anticorps primaire dirigé contre le c-Fos (IgG polyclonal de lapin, Santa Cruz Biotechnologie) à une dilution de 1 :1000 dans une solution de PBS contenant du Triton-X-100 0.3% et du NGS 1%. La journée suivante, les coupes ont été lavées et l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (IgG biotinylé fait chez la chèvre, Vector Lab) a été ajouté pour une période d'une heure. D'autres lavages ont été effectués avant d'ajouter une solution faite à partir de composés avidine et de complexe d'enzyme biotine (kit ABC, Vector lab) pendant une période d'une heure. Des lavages au PBS ont précédé la révélation grâce à l'application d'une solution contenant du 3,3-diaminobenzidine (DAB) 1 %, de nickel chloride 1 % et de peroxyde d'hydrogène 0.3 % pendant environ 5 minutes. Les coupes noircissaient légèrement et des lavages ont été effectués rapidement pour arrêter la réaction de révélation. Les coupes de moelles ont ensuite été placées sur des lames, déshydraté par passage dans des solutions d'éthanol à concentration croissante suivi de solution de xylène et une lamelle a été ajoutée afin de pouvoir les analyser au microscope.

10.1 Quantification du c-Fos

Entre 4-6 coupes de moelle, pour chaque animal, ont été sélectionnées selon la morphologie caractéristique des lombaires 4 et 5 (figure 7). Le nombre de cellules immunoréactives pour le c-Fos a été compté sous un grossissement de 10x au microscope. Les quantifications ont été faites du côté ipsilatéral (du même côté que l'injection de formaldéhyde dans la patte arrière, c'est-à-dire du côté droit) et contralatéral (du côté opposé à l'injection, donc côté gauche) de la moelle dans chacune des sections choisies. Grâce aux repaires anatomiques, les différentes sections suivantes ont été analysées : les laminae 1 et 2 ont été jumelées ensemble de même que les laminae 4 et 5, la lamina 3 et la lamina 10 ont été analysées, séparément (figure 7).

Figure 8 : Segments lombaires de moelle épinière



Schématisation des régions correspondant aux différentes laminae au niveau des segments lombaires 4 et 5 de la moelle épinière

Source : Grant G, Koerber HR. 2001. Spinal cord cytoarchitecture. In *The Rat Nervous System*, ed. G Paxinos, 5:121-126. Elsevier Academic Press.

11. Analyses statistiques des données

11.1 Test de la plaque chaude

Des moyennes du nombre de fois que l'animal léchait ses pattes arrière ont été faites pour chacun des groupes. L'analyse de variance (ANOVA) (groupe x moyenne de léchage) a été suivi d'un test post-hoc de type Bonferroni.

11.2 Test à la formaline

Des moyennes des niveaux de nociception ont été faites pour chacune des phases (phase 1 = 0-6 min, interphase= 9-18 min et phase 2= 21-60 min) et ont été analysées de façon indépendante afin d'évaluer les différents processus de nociception. Des ANOVA (nociception x groupe) suivies de tests *post-hoc* de type Bonferroni ont été réalisées pour chacune des phases.

11.3 Immunohistochimie du c-Fos

Afin de vérifier les différences d'expression de c-Fos entre les groupes de souris au niveau des différentes laminae des analyses statistiques ont été faites. Tout d'abord, des moyennes des niveaux d'expression ont été calculées pour chaque laminae et ce, pour chaque groupe. Par la suite, des ANOVA ont été réalisées séparément entre les groupes de mâles et les groupes de femelles (génotype x laminae x moyenne de c-Fos). Les tests *post-hoc* de type Bonferroni ont précisé à quels endroits se trouvaient ces différences significatives.

Une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée significative. Toutes les valeurs sont exprimées en fonction de la moyenne \pm erreur type (standard error to the mean : S.E.M.)

Résultats

Dans cette partie, les différents résultats obtenus durant ma maîtrise seront présentés selon deux sections distinctes. Ces sections correspondent aux 2 principaux projets de ma maîtrise.

12. Première partie : Implication des opioïdes et du GABA dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez le rat

Les résultats de cette section font suite aux projets antérieurs réalisés dans nos laboratoires. Il a été démontré que les niveaux de nociception sont plus élevés chez la femelle que chez le mâle, et ce, durant les trois phases du test à la formaline. Par ailleurs, il a été démontré que les hormones modulent chacune de ces phases (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Afin de mieux comprendre ces différences et pourquoi les mécanismes d'inhibition sont recrutés de façon moins importante chez la femelle que chez le mâle, nous nous sommes intéressés à certains neurotransmetteurs inhibiteurs pouvant être impliqués dans cette inhibition, soit les opioïdes et le GABA. Ce qui nous amène à la première section de mon projet de maîtrise.

12.1 Rôle des opioïdes

L'administration de différentes doses de naloxone en i.p. chez des animaux intacts des deux sexes nous a permis de déterminer l'implication des opioïdes au niveau de l'interphase du test à la formaline. Chez les femelles intactes (figure 9) les analyses de variance ont démontré que les niveaux de nociception en phase 1 et en phase 2 du test à la formaline ne sont pas modifiés par l'administration des différentes doses de naloxone (phase 1 : $p=0.9853$ et phase 2 : $p=0.0914$). Les analyses de variance chez les mâles intacts (figure 10) ont démontré la même chose, la phase 1 et la phase 2 n'ont pas été modifiées par le naloxone (phase 1 : $p=0.9985$ et phase 2 : $p=0.2181$). Par contre, l'interphase a été modifiée chez les femelles ($p=0.0005$) et chez les mâles ($p=0.0030$). Le test post-hoc a précisé que c'est les doses de 2 et 3 mg/kg qui augmentent

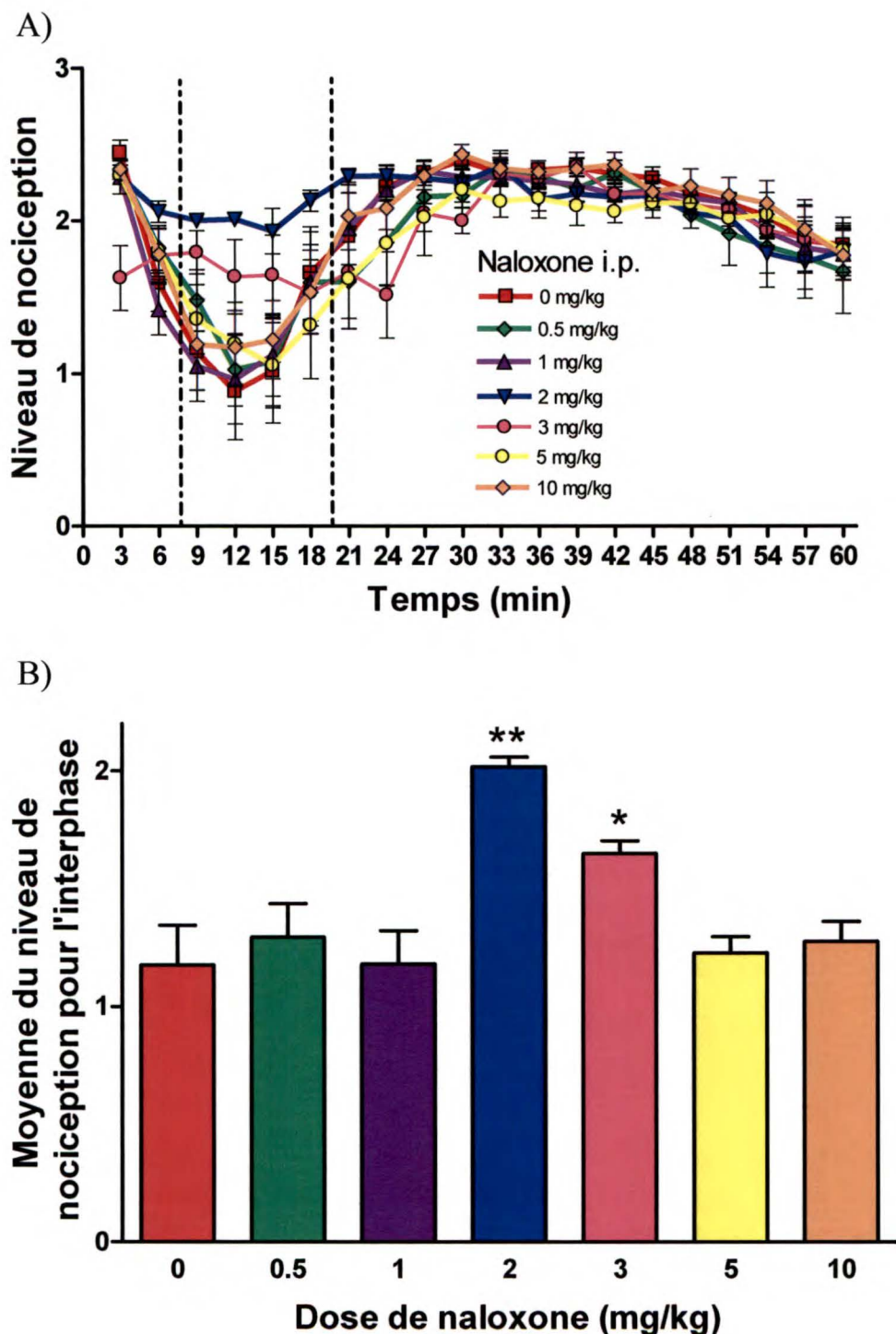


Figure 9 : Test à la formaline chez des femelles intactes ayant reçu du naloxone
 Différentes doses de naloxone ont été administrées en i.p., 5 min avant l'injection de formaldéhyde. A) Représentation des niveaux de nociception sur une période de 60 min pour chaque dose de naloxone utilisée. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, $n=6-8$ rats/dose, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$

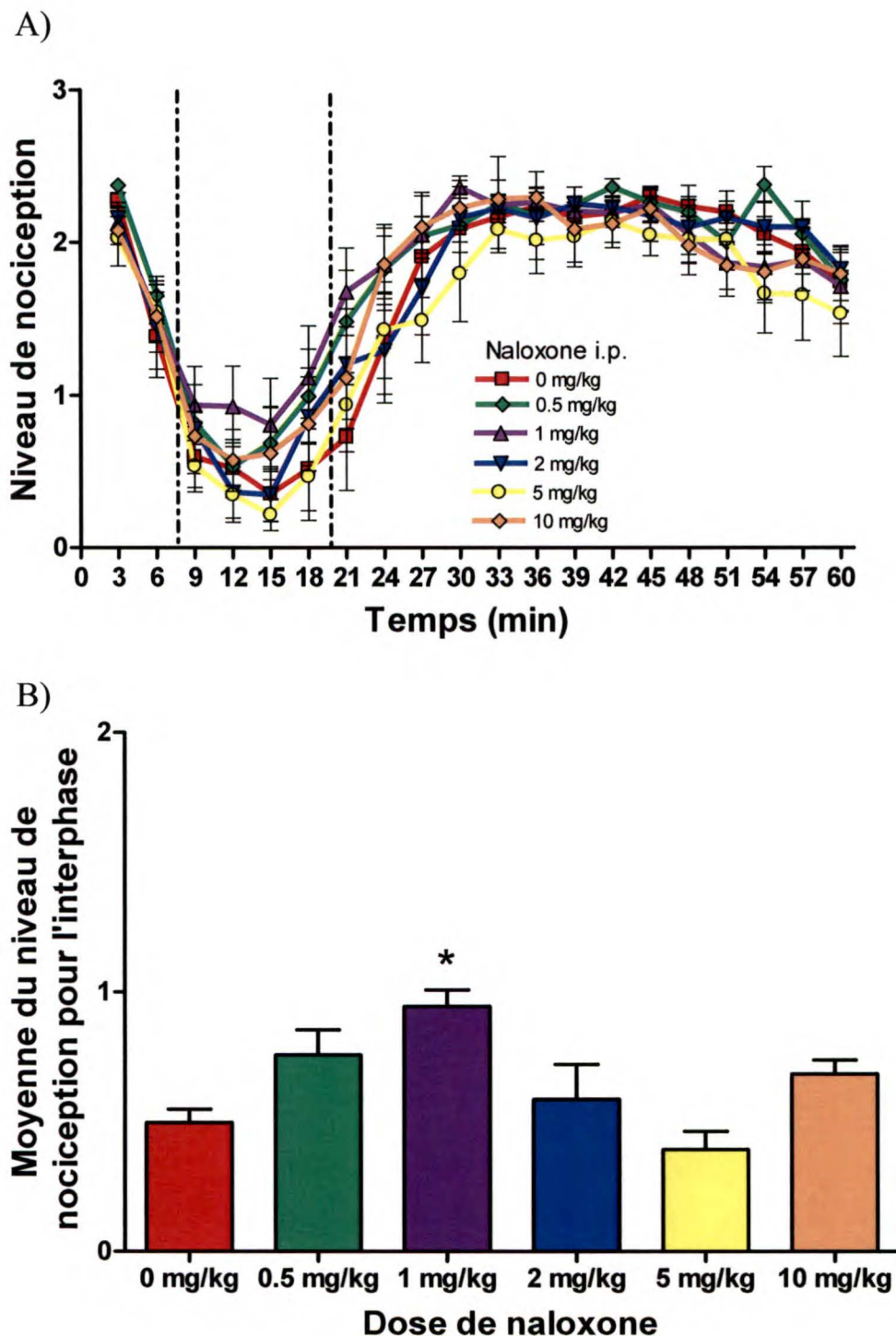


Figure 10 : Test à la formaline chez des mâles intacts ayant reçu du naloxone.

Différentes doses de naloxone ont été administrées en i.p., 5 min avant l'injection de formaldéhyde. A) Représentation des niveaux de nociception sur une période de 60 min pour chaque dose de naloxone utilisée. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, $n=8$ rats/dose, * $p < 0.05$

de façon significative les niveaux de nociception en interphase chez les femelles ($p < 0.05$) et qui réussissent par le fait même à bloquer 80% de l'interphase alors que chez les mâles seulement 20 % de l'interphase a été bloqué par la dose de 1 mg/kg ($p < 0.05$). Par conséquent, les opioïdes sont impliqués dans les mécanismes d'inhibition de l'interphase, mais dans des proportions différentes selon le sexe.

12.2 Rôles des hormones sexuelles

Des rats gonadectomisés ont été injectés avec différentes doses de naloxone afin de déterminer le rôle des hormones sexuelles dans l'implication des mécanismes d'inhibition opioïdérique en interphase du test à la formaline. Les femelles ovariectomisées (figure 11) et les mâles castrés (figure 12) présentent des résultats très similaires suite aux tests à la formaline en présence de naloxone. En fait, en regardant les courbes du test à la formaline, il est possible de constater que toutes les doses de naloxone utilisées induisent une augmentation des niveaux de nociception en interphase lorsque comparées aux contrôles (0 mg/kg) (figure 11a et 12a). L'analyse de variance démontre une différence significative de nociception en interphase en fonction de la dose chez les femelles ovariectomisées ($F=8.239$, $p=0,001$) et chez les mâles castrés ($F=4.920$, $p=0,0098$). Des moyennes des niveaux de nociception pour l'interphase des femelles ovariectomisées sont présentées à la figure 10b et l'analyse *post-hoc* démontrent que toutes les doses sont significativement différentes par rapport au contrôle (0,5 mg/kg : $p < 0.05$, 1 mg/kg : $p < 0.05$, 2 mg/kg : $p < 0.01$, 5 mg/kg : $p < 0.01$). Pour ce qui est des moyennes de nociception pour les mâles castrés, elles sont présentées à la figure 11B et le test *post-hoc* démontre que presque toutes les doses sont significativement différentes du contrôle (1 mg/kg : $p < 0.05$, 2 mg/kg : $p < 0.05$, 5 mg/kg : $p < 0.05$). La seule exception est la dose de 0,5 mg/kg qui présente seulement une tendance pour augmenter les niveaux de nociception chez les mâles castrés ($p > 0.05$). Il n'y a aucune différence significative au niveau de la phase 1 et 2 du test à la formaline chez les deux sexes, et ce, pour toutes les doses de naloxone utilisées.

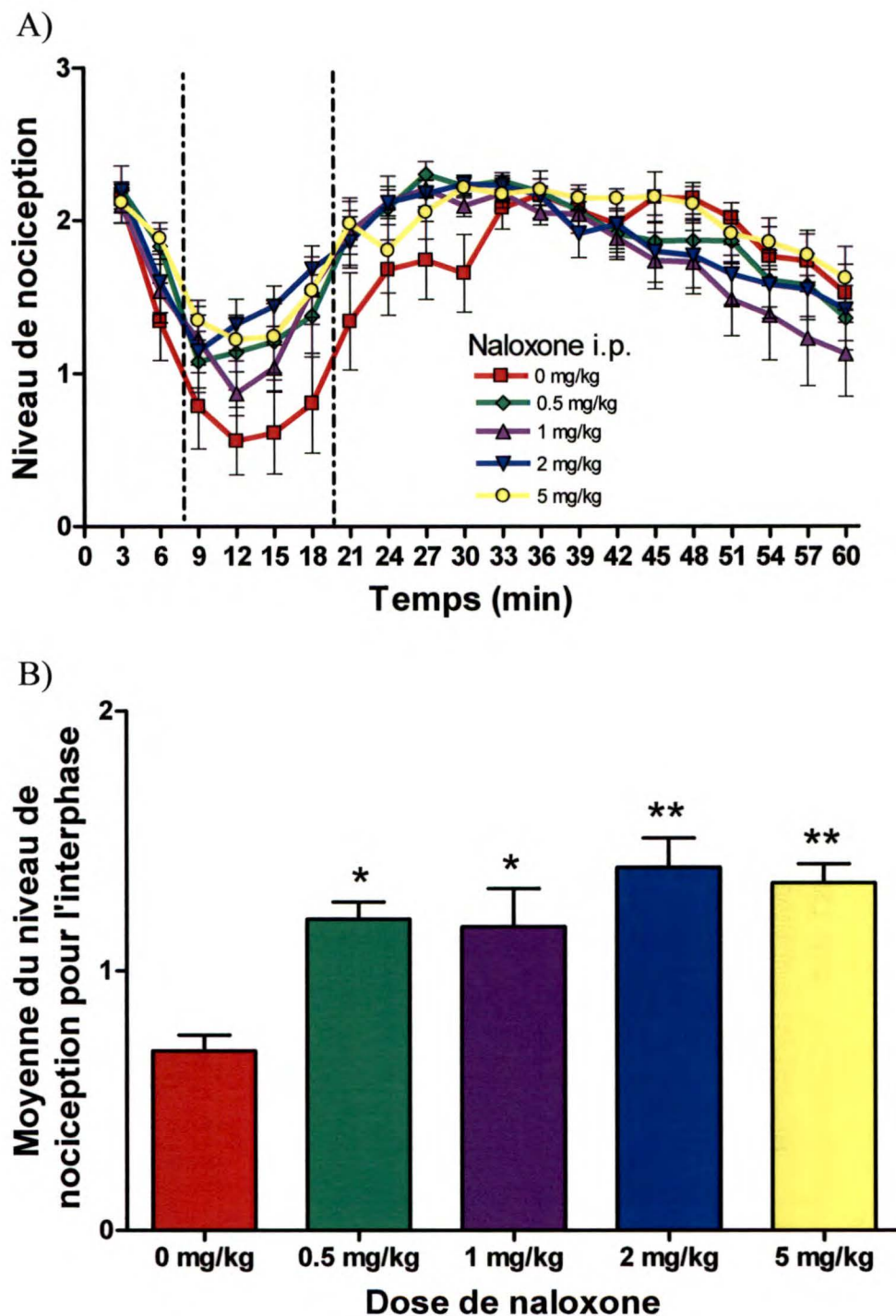


Figure 11: Test à la formaline chez des femelles OVX ayant reçu du naloxone.

Différentes doses de naloxone ont été administrées en i.p., 5 min avant l'injection de formaldéhyde. A) Représentation des niveaux de nociception sur une période de 60 min pour chaque dose de naloxone utilisée. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, $n=6-8$ rats/dose, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

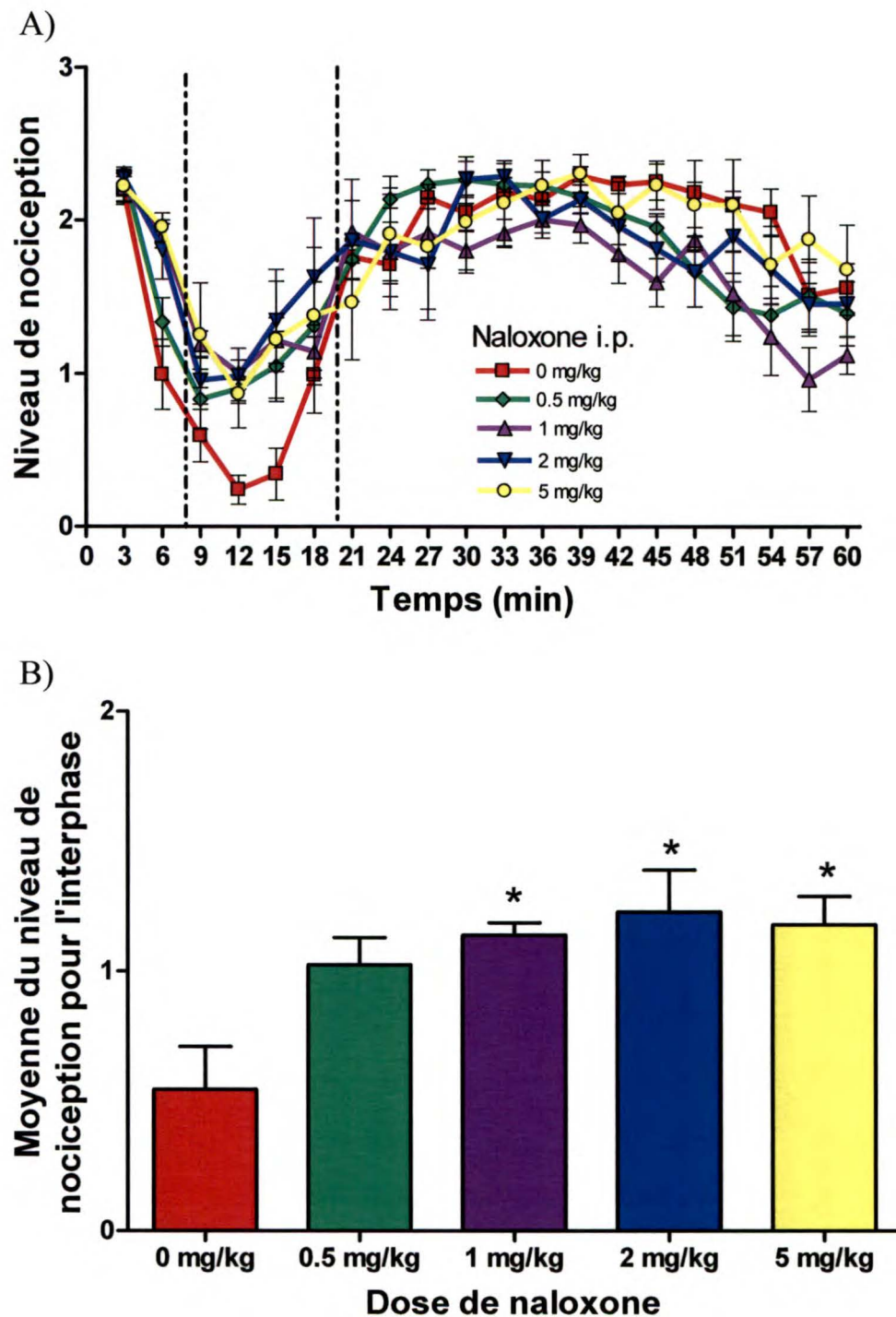


Figure 12: Test à la formaline chez des mâles castrés ayant reçu du naloxone.

Différentes doses de naloxone ont été administrées en i.p., 5 min avant l'injection de formaldéhyde 2 % dans la patte arrière. A) Représentation en fonction du temps des niveaux de nociception pour chaque dose. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, $n=6-8$ rats/dose, * $p < 0.05$

12.3 Rôle des récepteurs opioïdes μ , κ et δ

Des antagonistes spécifiques pour les différents sous-types de récepteurs aux opioïdes ont été utilisés chez des femelles intactes, afin de vérifier leurs implications respectives dans les mécanismes d'inhibition de l'interphase. Tel qu'illustré dans la figure 13A, aucun des antagonistes utilisés, soit le Naltrindole (delta), le Naltrexone (μ) et le Nor-BNI (κ), ne modifie de façon importante les niveaux de nociception lors du test à la formaline. De façon générale, les courbes pour les différents antagonistes se superposent pour la majeure partie du test à la formaline. Les analyses de variances révèlent qu'il n'y a pas de différence significative en phase 1 ($p=0.996$) et en interphase ($p=0.597$), alors qu'il y a une différence de groupe en phase 2 ($p=0.001$). L'analyse *post-hoc* indique que seulement le groupe ayant reçu le Naltrindole présente une diminution significative des niveaux de nociception par rapport au contrôle en phase 2 ($p<0.05$). Puisqu'aucun des trois antagonistes n'est capable de bloquer, à lui seul, l'inhibition induite en interphase par le système opioïdérique, les différentes combinaisons possibles d'antagonistes ont été administrées chez des groupes de rats avant d'effectuer le test à la formaline. La figure 13B démontre qu'une augmentation significative des niveaux de nociception en interphase a été obtenue lors de l'administration de Naltrindole et de Nor-BNI ($p<0.05$) ainsi qu'avec l'administration des trois antagonistes de façon concomitante ($p<0.01$). En conclusion, le système opioïdérique nécessite une action sur une combinaison spécifique de récepteurs opioïdériques afin d'induire l'inhibition en interphase.

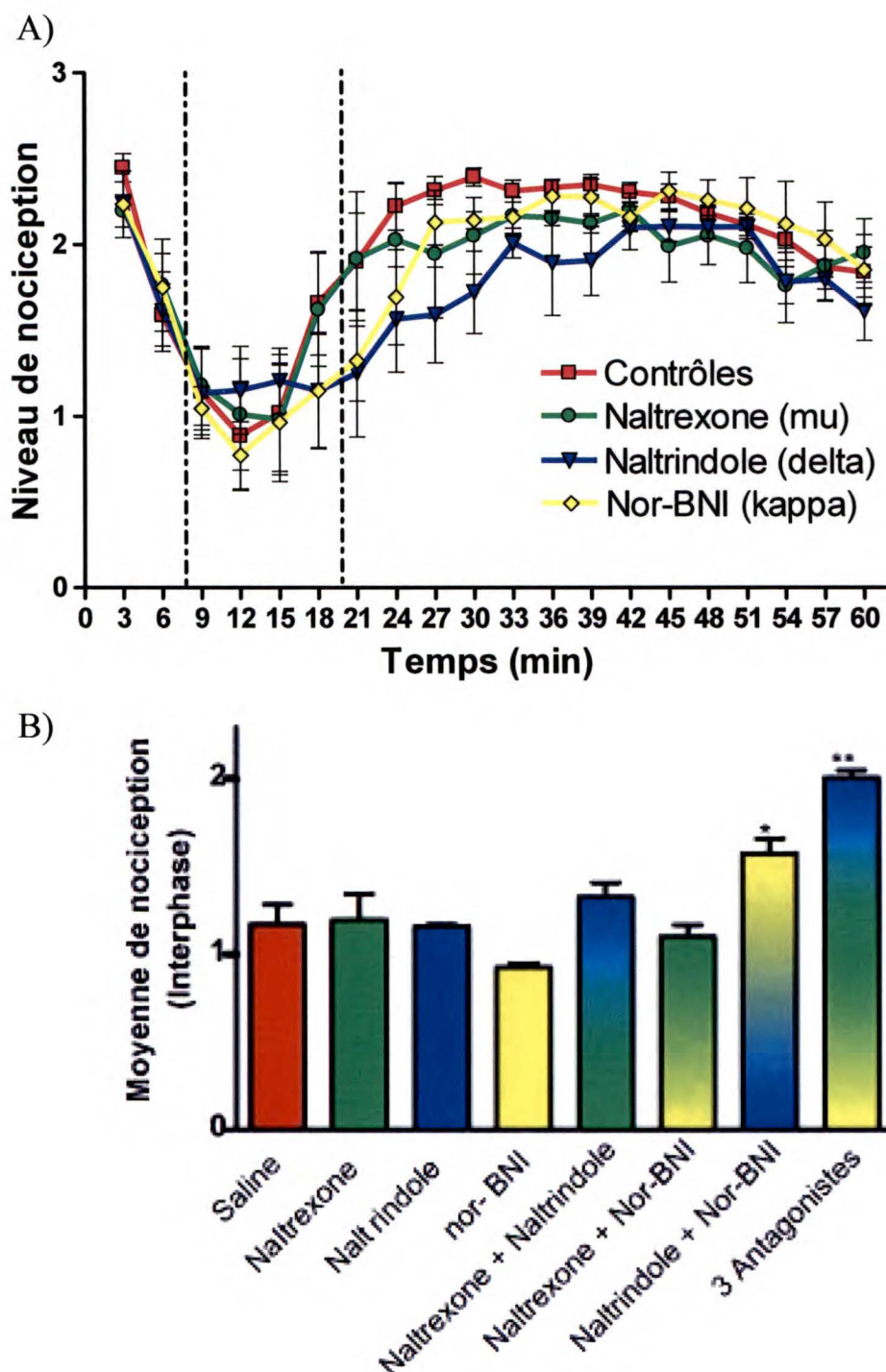


Figure 13: Test à la formaline en présence d'antagonistes spécifiques.

Antagonistes spécifiques des différents sous-types de récepteur aux opioïdes administrés seul ou bien en combinaison chez des femelles intactes. A) Représentation en fonction du temps des niveaux de nociception pour chaque antagoniste. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, n=6-8 rats/combinaisons, * $p < 0.05$

12.4 Localisation du système opioïdergique

L'utilisation de naloxone méthiodide permet de déterminer l'implication périphérique des opioïdes dans l'interphase. Cet antagoniste opioïdergique possède la même spécificité que le naloxone pour les différents sous-types de récepteurs, mais n'a pas la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, donc il bloque seulement les récepteurs périphériques. Lorsque le naloxone méthiodide est administré en i.p. préalablement aux tests à la formaline, aucune modification des niveaux de nociception n'est présente comparativement au groupe contrôle, et ce, pour toutes les phases du test (figure 14). Ces données permettent de croire que le mécanisme d'inhibition présent en interphase n'est pas périphérique. Par la suite, afin de vérifier l'implication du mécanisme d'inhibition opioïdergique au niveau spinal, des injections de naloxone ont été effectuées en i.t., de façon à bloquer seulement les récepteurs opioïdergiques spinaux (figure 15). L'analyse de variance a démontré qu'il y a une différence significative, selon la dose administrée, au niveau de l'interphase ($p=0.032$), alors qu'il n'y a pas de différence en phase 1 ($p=0.885$) ni en phase 2 (0.781). Par la suite, le test *post-hoc* de type Bonferroni a précisé que cette différence au niveau de l'interphase est seulement présente entre le groupe ayant reçu la dose de 0.1 mg/kg de naloxone et le groupe contrôle (0 mg/kg) (figure 14b). Le groupe ayant subi une injection i.t. de naloxone 0.1 mg/kg démontre une augmentation significative ($p<0.05$) du niveau de nociception en interphase comparativement au groupe contrôle. Par conséquent, le mécanisme d'inhibition opioïdergique de l'interphase possède une certaine composante spinale.

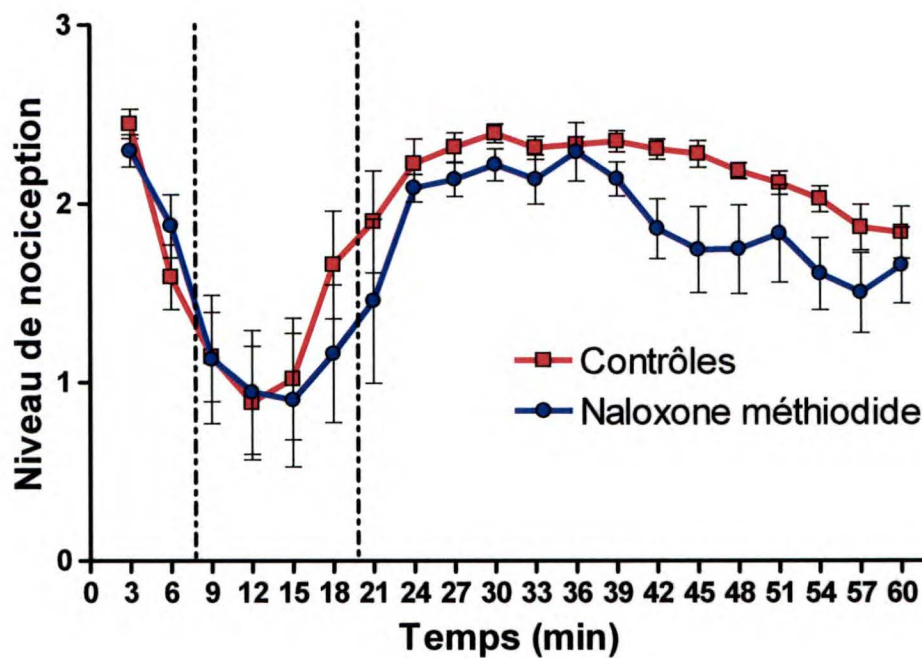


Figure 14 : Tests à la formaline en présence de naloxone méthiodide.

Ces tests ont été effectués pour déterminer l'implication périphérique du système opioïdérique dans les mécanismes d'inhibition chez des femelles intactes. Injection de naloxone méthiodide 10 mg/kg en i.p., 5 min avant l'injection de formaldéhyde. Les rats du groupe contrôle ont été injectés avec de la saline. Moyenne \pm S.E.M, n=6-8 rats/groupe

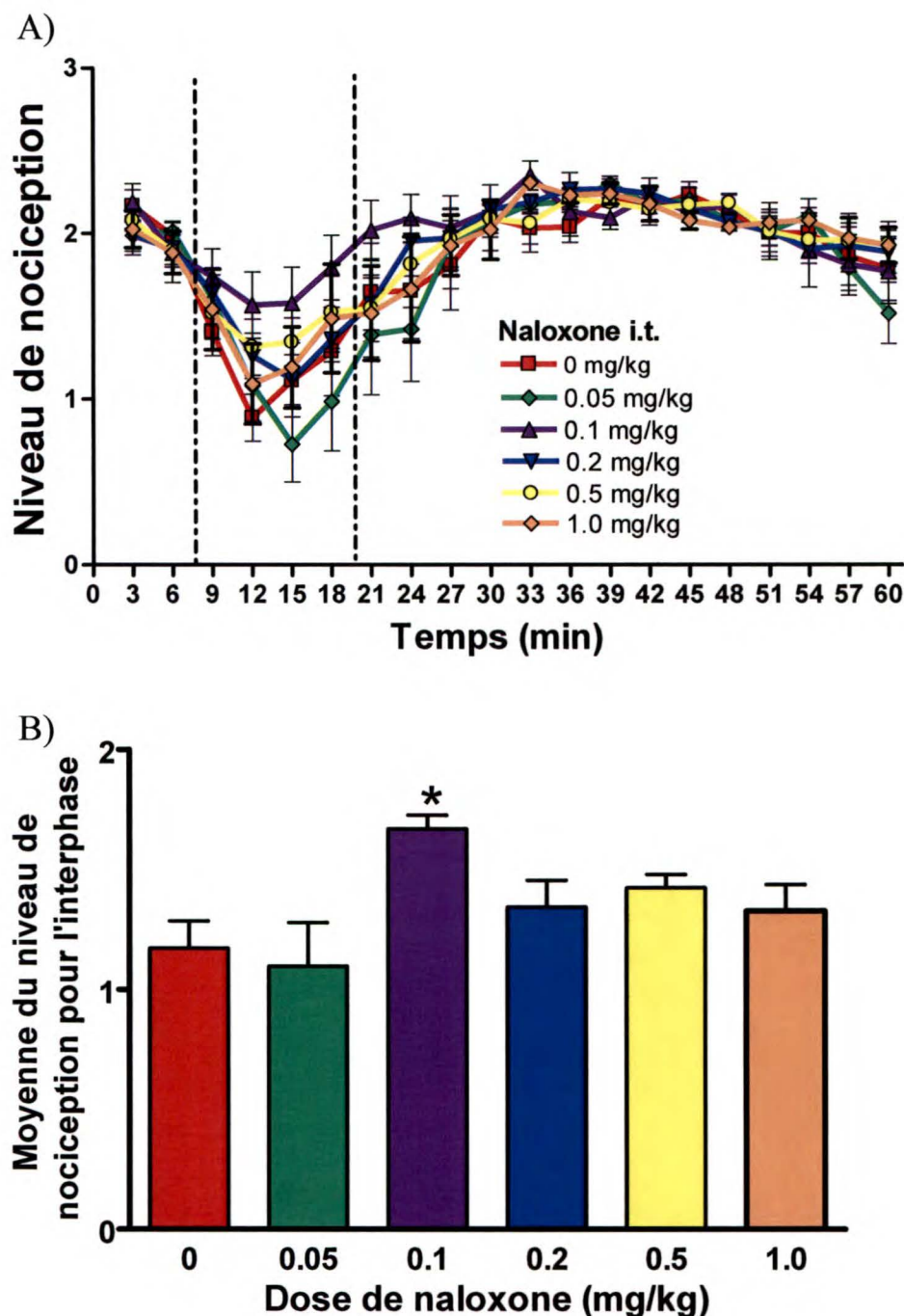


Figure 15 : Tests à la formaline en présence d'antagonistes opioïdiques.

Ces tests ont été effectués pour déterminer la localisation du système opioïdique dans les mécanismes d'inhibition chez des femelles intactes. Injection de différentes doses de naloxone en i.t. (0-1.0 mg/kg), 10 min avant l'injection de formaldéhyde. A) Représentation en fonction du temps des niveaux de nociception pour chaque dose. B) Schématisation de la moyenne du niveau de nociception durant l'interphase (9-18 min). Moyenne \pm S.E.M, n=6-8 rats/groupe, * $p < 0.05$

12.5 Implication du GABA

L'utilisation de la bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A, chez des animaux intacts des deux sexes a permis de vérifier l'implication du GABA dans les mécanismes d'inhibition présents dans l'interphase du test à la formaline. Les données obtenues avec les animaux ayant subi des injections i.t. de bicuculline préalablement au test à la formaline sont présentées à la figure 16. Aucune différence n'est présente entre le groupe de femelles contrôle (saline i.t.) et le groupe de femelles ayant reçu la bicuculline, et ce, au niveau de toutes les phases du test à la formaline (figure 16a). Par contre, en observant le graphique des mâles (figure 16b), il est possible de constater que le niveau de nociception en interphase est supérieur en présence de la bicuculline. Ces données suggèrent que le recrutement des mécanismes d'inhibition est diminué en présence de cet antagoniste. Donc, le GABA semble être impliqué dans les mécanismes d'inhibition chez le mâle, mais pas chez la femelle.

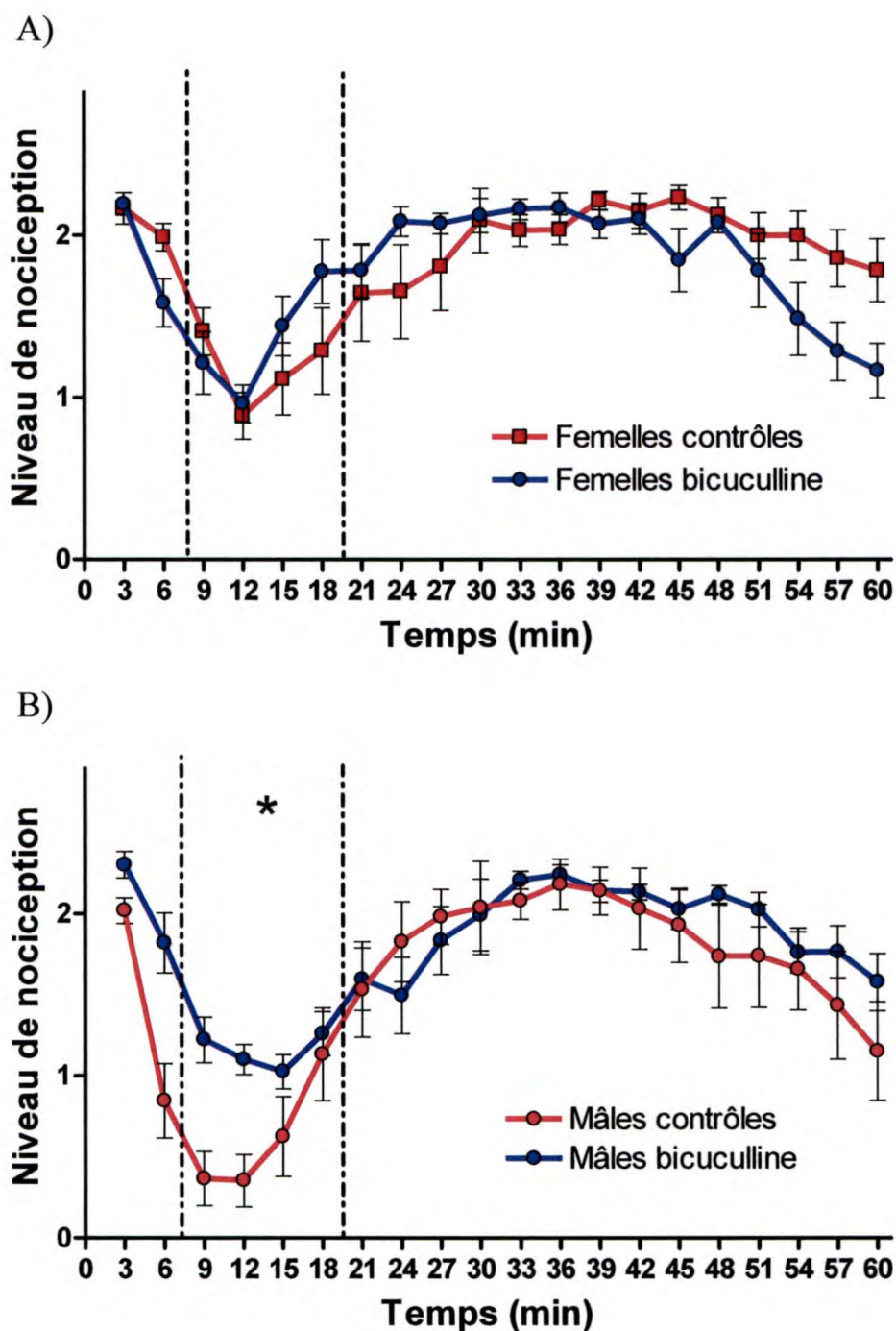


Figure 16 : Tests à la formaline en présence de bicuculline.

Cet antagoniste gabaergique a été administré en i.t. sous anesthésie à l'isoflurane 3 %, 15 min avant l'injection de formaldéhyde 2 % dans la patte arrière. Un volume de 50 μ l contenant 2 μ g de bicuculline a été injecté chez les groupes expérimentaux alors que les groupes contrôles ont été injectés avec 50 μ l de saline. A) Femelles; B) Mâles; Moyenne \pm S.E.M, n=6-8/groupe, * p< 0.05

13. Deuxième partie: Rôles du récepteur bêta de l'estrogène dans différents processus de nociception

Des souris C57BL/6 des deux sexes, normales et déficientes pour ER- β ont été utilisées pour évaluer l'implication du récepteur bêta de l'estrogène dans les processus aigus et toniques de nociception ainsi que dans des mécanismes d'inhibition de la douleur.

13.1 Test de la plaque chaude

Le test de la plaque chaude a été effectué dans le but de vérifier l'implication de ER- β dans un processus aigu de nociception de nature thermique. Tel qu'illustré à la figure 17, la moyenne de léchage est très similaire entre les deux groupes de femelles (WT : 13.63 ± 1.33 vs KO : 14.86 ± 1.83) ainsi qu'entre les deux groupes de mâles (WT : 8.79 ± 1.35 vs KO : 9.37 ± 1.54). L'analyse de variance (ANOVA) démontre qu'il n'y a pas de différence significative dans la moyenne de léchage lorsque les animaux du même sexe, mais ayant un génotype différent pour ER- β , sont comparés entre eux. Par contre, lorsque l'analyse est faite en fonction du sexe, une différence significative est présente. Les groupes de femelles ont une moyenne de léchage plus élevée que les groupes de mâles ($p=0.0014$), suggérant que le sexe, mais pas le génotype de ER- β , crée des différences entre les groupes au niveau de ce test. Par conséquent, ER- β ne semble pas être impliqué dans les processus de douleur aiguë de nature thermique chez les deux sexes.

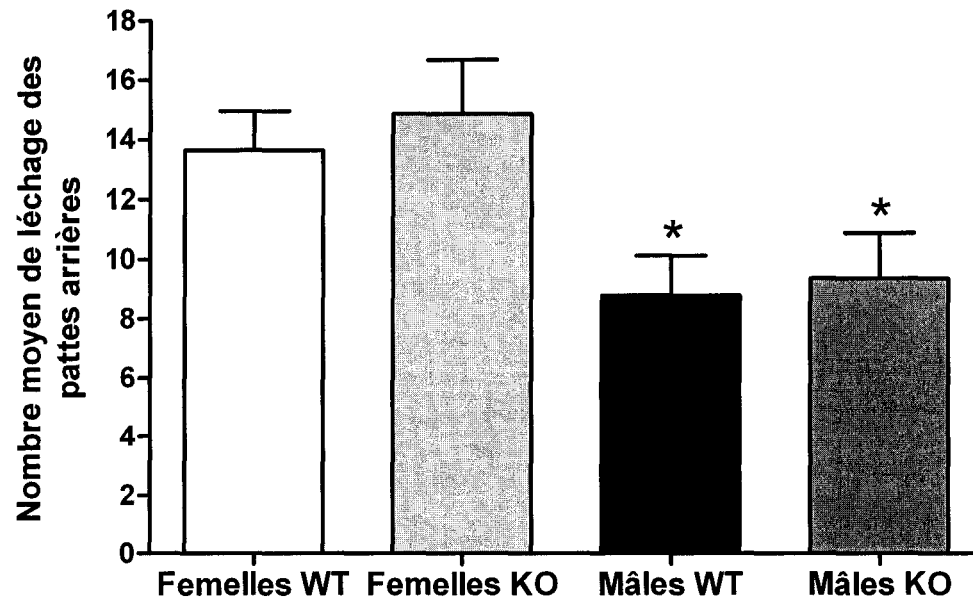


Figure 17 : Tests de la plaque chaude effectués chez des souris.

Des animaux WT et ER- β KO, des deux sexes, ont été placés sur une plaque à 47,2 °C pendant 4 min. Une moyenne du nombre de fois que les animaux ont léché leurs pattes arrière a été portée en graphique. Moyenne \pm S.E.M, n=7-9 souris/groupe, * p<0.05 lorsque comparé à leur groupe de femelles respectif.

13.2 Rôle de ER- β dans le test à la formaline

L'utilisation de souris déficientes (KO) ou non (WT) pour ER- β nous a permis d'évaluer l'implication de ER- β dans un processus aigu (phase 1) et tonique (phase 2) de nature chimique ainsi que dans un mécanisme endogène d'inhibition de la douleur (interphase). Les courbes obtenues suite au test à la formaline ont l'allure typique dans chacun des groupes. Les analyses statistiques démontrent qu'il y a une différence significative entre les groupes en interphase ($p=0.0223$), alors qu'il y a aucune différence significative en phase 1 ($p=0.924$) et en phase 2 ($p=0.326$) selon le génotype pour ER- β . Le test *post-hoc* révèle que cette différence au niveau de l'interphase est présente entre les femelles seulement (figure 18 et 19). Les femelles WT ont des niveaux de nociception plus élevés que les femelles KO durant l'interphase ($p<0.05$) (figure 18). Les moyennes du niveau de nociception en interphase sont: femelles WT = 0.972 ± 0.096 ; femelles KO = 0.494 ± 0.058 . Malgré le fait que les niveaux de nociception des femelles KO semblent légèrement diminués en début de phase 2 comparativement aux femelles WT, les analyses sont non significatives. Ces données démontrent que ER- β est impliqué seulement dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez les femelles, alors que ER- β ne semble avoir aucune implication dans les processus nociceptifs chez les mâles.

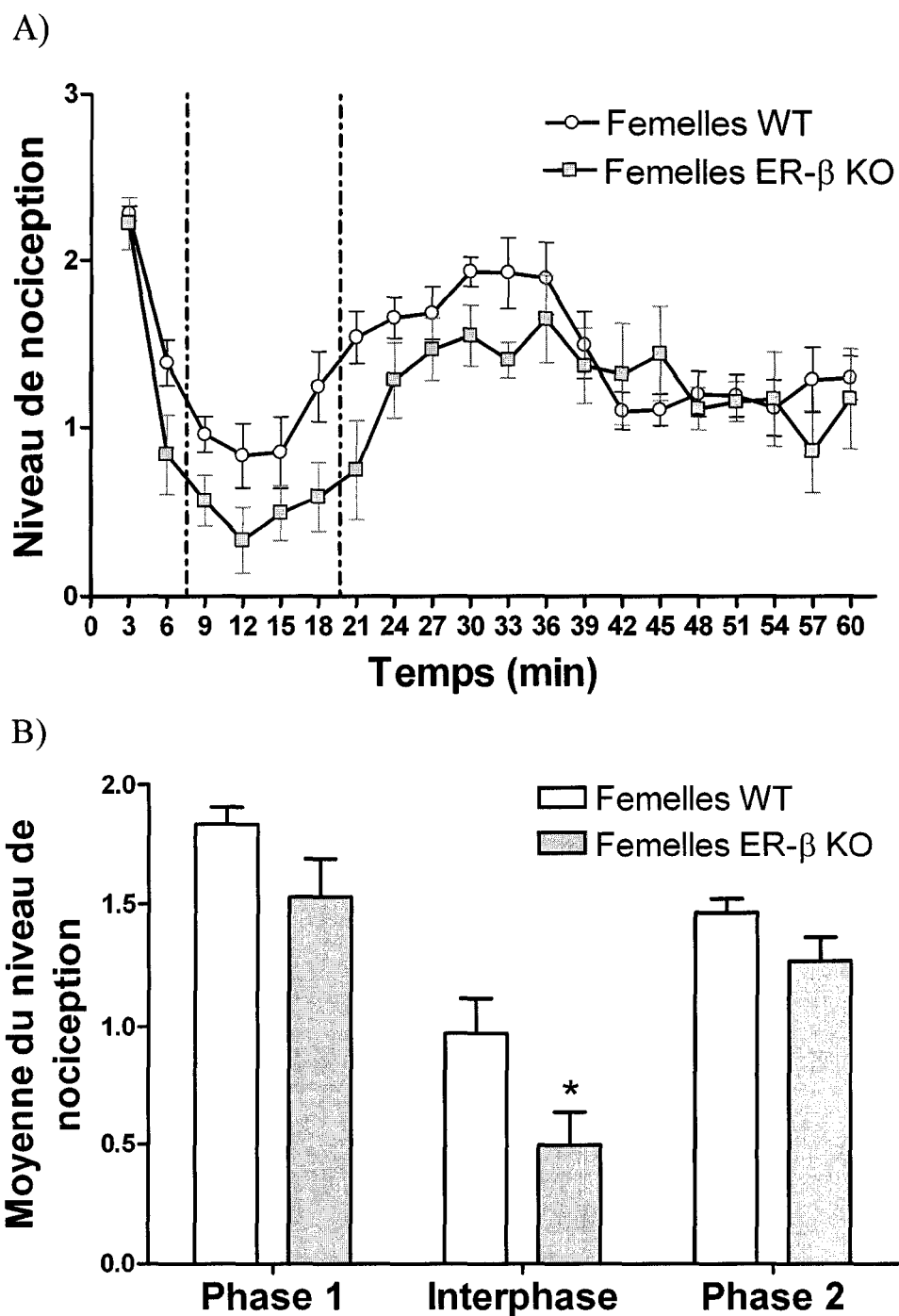


Figure 18 : Tests à la formaline effectués chez des femelles ER- β KO et WT.

A) Représentation des niveaux de nociception sur une période de 60 min suite à l'injection de formaldéhyde 2 % dans la patte arrière droite de la souris. B) Moyenne du niveau de nociception pour chacune des phases. Moyenne \pm S.E.M, n=7-8 souris/groupe, * p<0.05.

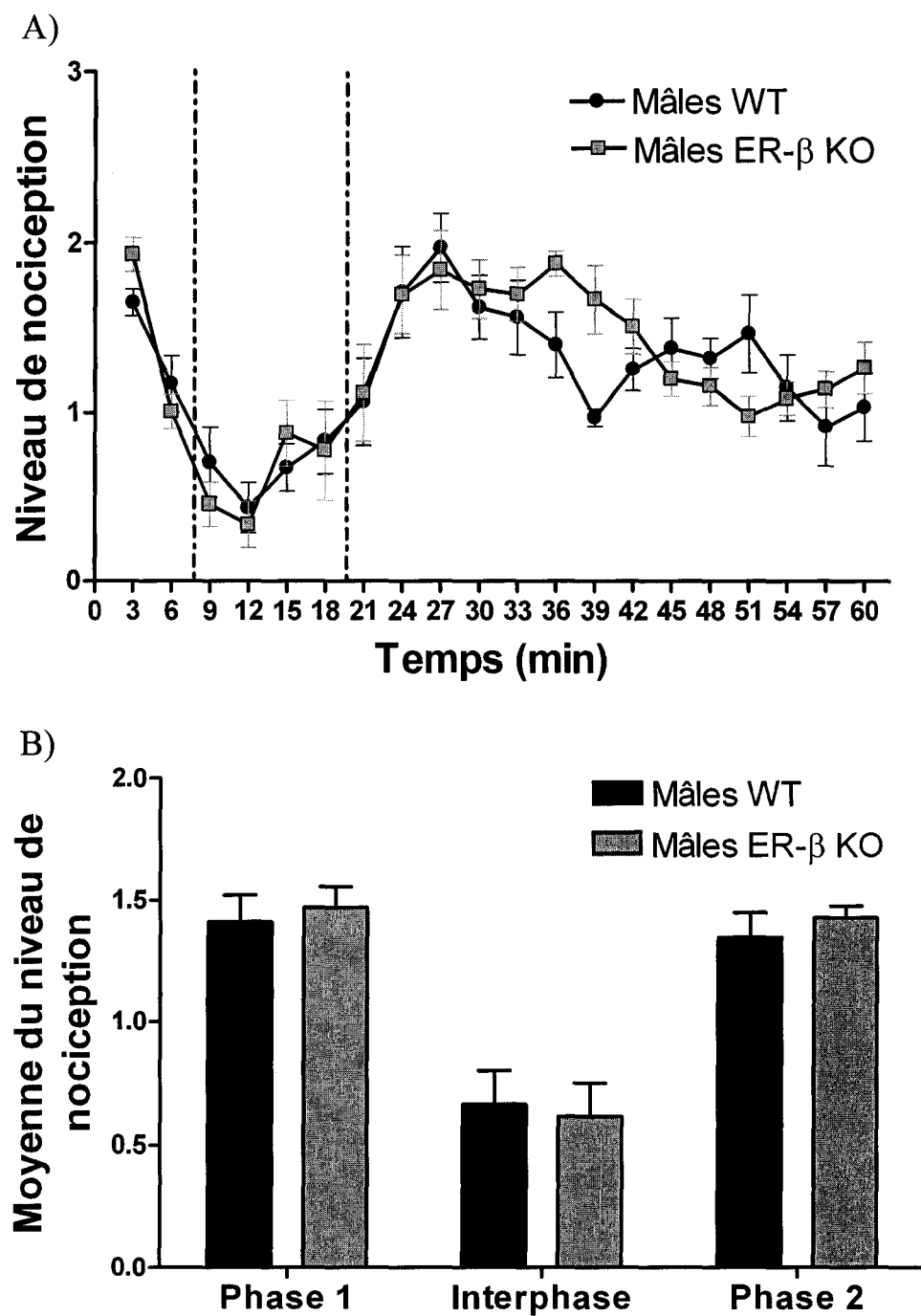


Figure 19 : Tests à la formaline effectués chez des mâles ER- β KO et WT.

A) Représentation des niveaux de nociception sur une période de 60 min suite à l'injection de formaldéhyde 2 % dans la patte arrière droite de la souris. B) Moyenne du niveau de nociception pour chacune des phases. Moyenne \pm S.E.M, n=8-9 souris/groupe.

13.3 Immunohistochimie du c-Fos

Suite aux tests à la formaline effectués chez les souris ER- β KO et WT des deux sexes, des analyses immunohistochimiques ont été réalisées afin de quantifier les niveaux de c-Fos dans différentes laminae de la moelle qui sont impliquées dans les processus de nociception. Aucune modification significative n'a eu lieu du côté contralatéral dans toutes les laminae étudiées, et ce, pour tous les groupes (figure 20b et 21b). Le côté ipsilatéral est particulièrement intéressant, puisque c'est à cet endroit que les importantes modifications se sont produites. C'est au niveau des laminae 1 et 2 et des laminae 4 et 5 que se retrouvent le plus de cellules immunoréactives pour le c-Fos. Les niveaux sont aussi légèrement augmentés dans la lamina 3 et dans la lamina 10. Des analyses de variance révèlent que chez les groupes de femelles il y a des différences significatives selon le génotype et selon les différentes sections analysées. En fait, les femelles KO ont significativement moins de c-Fos dans les laminae 1 et 2 ($p < 0.01$) ainsi que dans les laminae 4-5 ($p < 0.01$) comparativement aux femelles WT (figure 20a). Par contre, il n'y a aucune différence significative au niveau de la lamina 3 ($p > 0.05$) et de la lamina 10 ($p > 0.05$). Pour ce qui est des groupes de mâles, l'analyse de variance révèle qu'il y a aucune différence significative au niveau des différentes sections observées du côté ipsilatéral (figure 21a). Il est à noter que la quantification du c-Fos n'a pas été effectuée chez des souris contrôles, c'est-à-dire non traité à la formaline, puisqu'il est connu que les niveaux de c-Fos sont très faibles en condition basale (Orendacova et al. 2001, Tolle et al. 1990, Hunt et al. 1987).

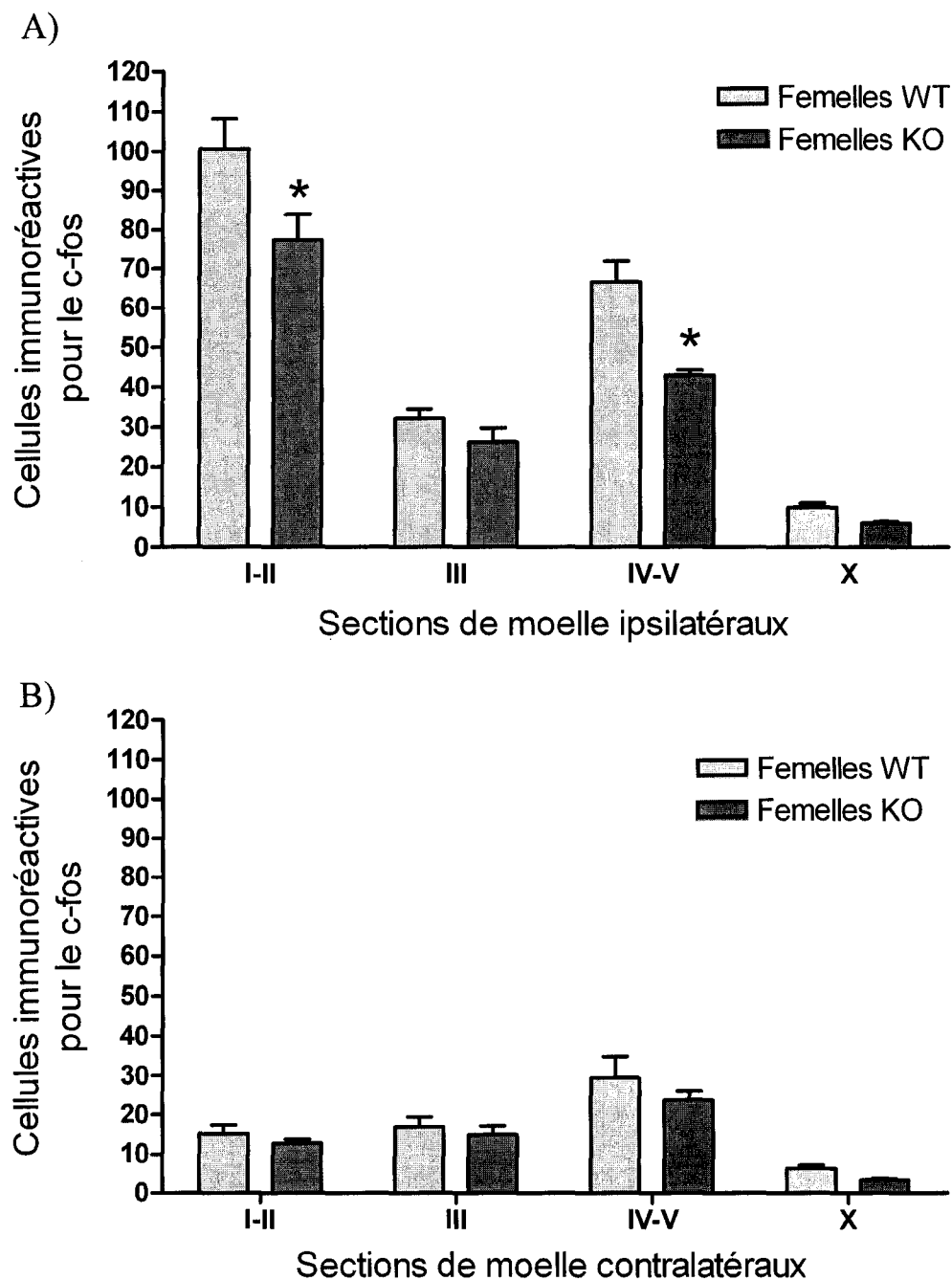


Figure 20 : Quantification du c-Fos chez des femelles ER- β KO et WT

Les analyses immunohistochimiques ont été faites sur des coupes de moelles de lombaires 4 et 5 suite au test à la formaline chez des femelles ER- β KO et WT. Moyenne du nombre de cellules immunoréactives pour le c-Fos au niveau de différentes sections de la moelle. A) Côté ipsilatéral et B) côté contralatéral de la moelle par rapport à l'injection de formaldéhyde dans la patte. Moyenne \pm S.E.M, n=4-5 souris/groupe, * $p < 0.01$

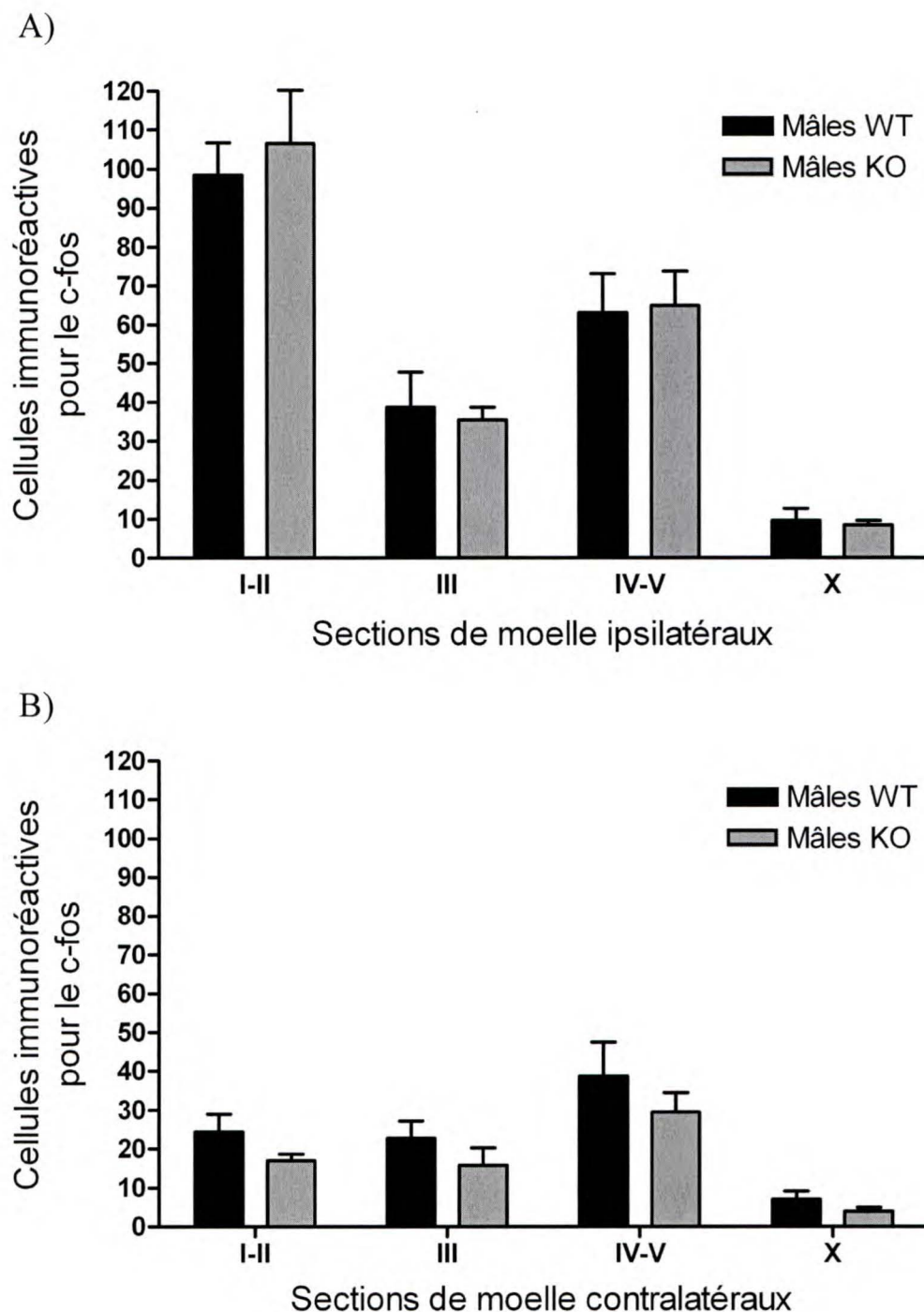


Figure 21 : Quantification du c-Fos chez des mâles ER- β KO et WT

Les analyses immunohistochimiques ont été faites sur des coupes de moelles de lombaires 4 et 5 suite au test à la formaline chez des mâles ER- β KO et WT. Moyenne du nombre de cellules immunoréactives pour le c-Fos au niveau de différentes sections de la moelle. A) Côté ipsilatéral et B) côté contralatéral de la moelle par rapport à l'injection de formaldéhyde dans la patte. Moyenne \pm S.E.M, n=4-5 souris/groupe

Discussion

Ces études ont permis de démontrer que les hormones sexuelles modulent le recrutement des mécanismes d'inhibition en interphase qui sont principalement opioïdiques chez la femelle et gabaergique chez le mâle. Par ailleurs, chez la femelle, le rôle pronociceptif de l'estrogène en interphase semble être médié, du moins en partie, à son action sur les récepteurs estrogénique bêta.

14. Première section : Implications des opioïdes et du GABA dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez le rat

Nous avons démontré que les systèmes opioïdiques sont recrutés dans des proportions différentes selon le sexe au niveau de l'interphase chez des rats intacts. Les mécanismes d'inhibition sont principalement opioïdiques chez la femelle et de nature non opioïdique chez le mâle. Suite à ces résultats, nous avons évalué l'implication du GABA au niveau de l'interphase, pour découvrir que ce neurotransmetteur semble impliqué dans une part importante des mécanismes d'inhibition chez les mâles uniquement. L'utilisation d'animaux gonadectomisés, a permis de confirmer que les hormones sexuelles jouent un rôle important dans le recrutement des mécanismes d'inhibition opioïdiques. Par ailleurs, les opioïdes semblent médier leurs effets via une combinaison des sous-types de récepteurs aux opioïdes (kappa et delta) grâce à des actions au niveau spinal et probablement supraspinal (voir résumé à la figure 22).

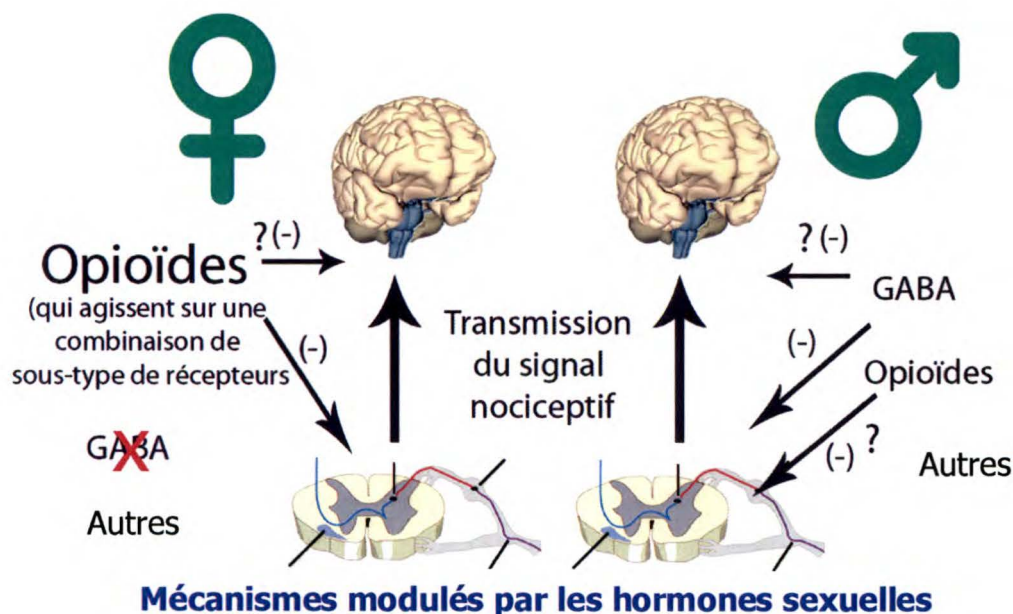


Figure 22 : Molécules impliquées dans les mécanismes d'inhibition.

Conclusions obtenues suite à l'analyse des résultats de la section 1 du mémoire concernant les mécanismes qui sont présents lors de l'interphase du test à la formaline chez des rats mâles et femelles. Lors de la transmission du signal nociceptif provenant de la périphérie vers la moelle et ensuite au niveau des centres supérieurs, des mécanismes d'inhibition opioïdiques et gabaergiques sont mis en place. Chez la femelle, les opioïdes sont majoritairement responsables de l'inhibition, alors que le GABA n'a aucune implication. Par ailleurs, l'implication des opioïdes, chez la femelle, possède une composante spinale et peut-être une composante supraspinale. Chez le mâle, le GABA est responsable d'une partie de l'inhibition tout comme les opioïdes dans une plus faible proportion. D'autres neurotransmetteurs, non déterminés, sont aussi impliqués. (-) = inhibition, ? = implication incertaine, X = neurotransmetteurs non impliqués.

14.1 Rôle des opioïdes et des hormones sexuelles

Certaines études ont déjà étudié les effets du naloxone et d'autres antagonistes opioïdiques lors du test à la formaline. Aucune de ces études ne s'est intéressée à l'interphase, ni aux femelles. Des résultats divergents ont été obtenus par différents groupes de recherche qui se sont intéressés aux effets des antagonistes des récepteurs aux opioïdes sur la douleur induite dans le modèle du test à la formaline (voir le review de (Porro & Cavazzuti 1993). De l'hyperalgésie a été reportée au cours de la phase 2 suite à l'administration de naloxone par différentes méthodes. Plusieurs études contredisent l'effet hyperalgésique du naloxone en phase 2 tout comme le démontrent nos résultats. Une explication possible se trouve du côté méthodologique, plus précisément concernant la façon d'analyser les résultats. En fait, la plupart des études, qui ont observé un effet significatif des antagonistes opioïdiques, ont analysé séparément les comportements de léchage et de flexion (Porro & Cavazzuti 1993). Un score de douleur, comme nous avons utilisé, rend de légères modifications dans un des comportements nociceptifs non détectables statistiquement.

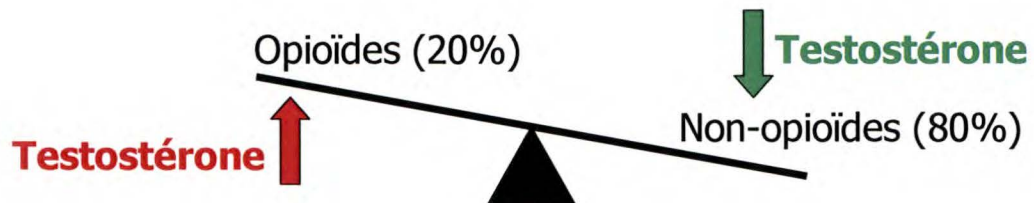
En se concentrant sur la phase inhibitrice du test à la formaline, nos expérimentations ont permis de conclure que le naloxone augmente les niveaux de nociception en interphase chez les animaux intacts et gonadectomisés des deux sexes, mais de façon différente. Nous avons démontré que les systèmes opioïdiques étaient recrutés dans des proportions différentes selon le sexe au niveau de l'interphase chez des rats intacts. Chez les femelles intacts (figure 9), environ 80 % des mécanismes d'inhibition présents en interphase sont médiés par des opioïdes alors que cette proportion est de seulement 20 % chez les mâles (figure 10). Par contre, chez les animaux gonadectomisés, les opioïdes sont responsables d'environ 50 % de l'inhibition, et ce, chez les deux sexes (figure 11 et 12). Il est facile de constater que la balance entre les mécanismes d'inhibition opioïdiques et les mécanismes non opioïdiques est grandement influencée par les HS, puisque la principale différence entre ces groupes est la condition hormonale (intact ou gonadectomisé). Par conséquent, tel qu'illustré à la figure 23 les HS peuvent agir à plusieurs endroits pour

modifier l'implication des différents mécanismes d'inhibition de la nociception en interphase. En fait, les 4 hypothèses possibles sont: la testostérone inhibe les mécanismes opioïdiques; la testostérone active les mécanismes non opioïdiques; l'estrogène et/ou la progestérone activent les mécanismes opioïdiques ou bien l'estrogène et/ou la progestérone inhibent les mécanismes non opioïdiques. Il se peut qu'une seule de ces hypothèses soit véridique ou bien qu'une combinaison de ces effets soit présente. Par contre, nos études ne permettent pas d'identifier avec précision les mécanismes impliqués. Des supplémentations hormonales, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs des hormones sexuelles ou bien l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour les récepteurs des hormones sexuelles permettraient de clarifier le rôle de chaque hormone. Les mécanismes d'inhibition présents au niveau de l'interphase ne sont pas les seuls mécanismes d'analgésie à impliquer différents types de neurotransmetteurs et à être modulés par les HS. Il est très bien connu que l'analgésie induite par la nage forcée fait intervenir des mécanismes d'inhibition opioïdiques et non opioïdiques (Lipa & Kavaliers 1990, Romero & Bodnar 1986). De plus, les neurotransmetteurs impliqués dépendent de la condition hormonale. En fait, il a été démontré que l'analgésie induite par la nage forcée pouvait être bloquée chez les mâles intacts et les femelles OVX par un antagoniste des récepteurs NMDA, alors que cet antagoniste n'a aucun effet chez les femelles intactes (Kavaliers et al. 1997, Mogil et al. 1993). Ces données suggèrent que le système d'analgésie endogène non opioïdique induit par la nage forcée n'implique pas les mêmes molécules chez les femelles (Mogil & Belknap 1997) que chez les mâles.

A) Animaux gonadectomisés



B) Mâles intacts



C) Femelles intacts

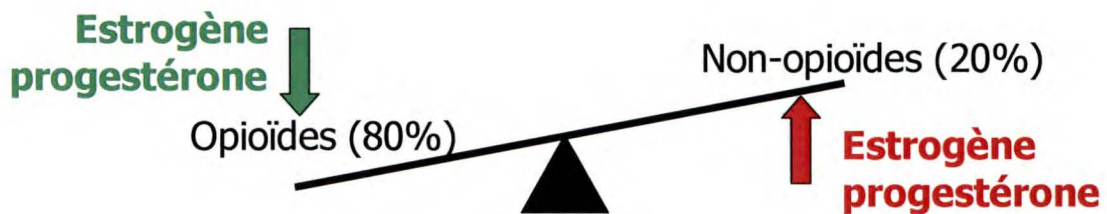


Figure 23 : Mécanismes d'inhibition opioïdergiques et non opioïdergiques.

Schématisation des proportions dans lesquelles les mécanismes d'inhibition opioïdergiques et non opioïdergiques sont recrutés lors de l'interphase du test à la formaline. Données obtenues chez des rats des deux sexes ayant des conditions hormonales différentes. Les rôles activateurs des hormones sexuelles sont représentés en verts alors que leurs rôles inhibiteurs sont en rouges. A) Animaux gonadectomisés, B) Mâles intacts, C) Femelles intacts.

Lorsque les résultats obtenus chez les animaux gonadectomisés sont comparés à ceux des animaux intacts, nous constatons que l'efficacité des différentes doses de naloxone n'est pas la même selon la condition hormonale. Seules les doses de 2 mg/kg et de 3 mg/kg de naloxone sont capables de produire un blocage presque complet de l'interphase chez les femelles intacts (figure 9), alors que chez les mâles intacts, seule la dose de 1 mg/kg induit une légère augmentation des niveaux de nociception en interphase (figure 10). Par ailleurs, les animaux gonadectomisés des deux sexes répondent pratiquement de façon identique à toutes les doses de naloxone (figure 11-12). La dose de 2 mg/kg est la dose qui produit la plus grande augmentation des niveaux de nociception chez les animaux gonadectomisés comme chez les femelles. Ces observations ont mené à plusieurs hypothèses. Il est bien établi que les hormones sexuelles peuvent moduler l'expression des différents sous-types de récepteurs ainsi que la relâche d'opioïdes au niveau du SNC (Craft et al. 2004, Amandusson et al. 1999, Amandusson et al. 1995). Les récepteurs des opioïdes et des hormones sexuelles co-localisent sur des neurones du SNC et de la périphérie. Par la liaison à leurs récepteurs, l'estrogène et la testostérone peuvent moduler les systèmes opioïdergiques endogènes (Aloisi & Ceccarelli 2000). Par conséquent, il serait plausible que l'interphase implique des peptides opioïdes endogènes et des sous-types de récepteurs différents selon la condition hormonale et le sexe. Il a déjà été proposé que les systèmes opioïdergiques impliqués dans le contrôle de la sensibilité à la douleur diffèrent entre les rongeurs de sexe différent (Wiesenfeld-Hallin 2005). De plus, la naloxone est un antagoniste non spécifique, mais il ne possède pas la même affinité pour les différents sous-types de récepteurs. ($\mu > \kappa \gg \delta$) (Fillingim & Gear 2004, Pasternak 1993). Il se pourrait que selon les types de récepteurs exprimés et opioïdes libérés, les doses efficaces de naloxone ne soient pas les mêmes. Cette spécificité pourrait expliquer que seulement certaines doses soient efficaces alors que les doses inférieures et supérieures ne produisent aucun effet.

14.2 Sous-type de récepteurs impliqués

Dans le but de préciser quel sous-type de récepteurs aux opioïdes (mu, kappa et delta) est impliqué dans l'inhibition de la nociception induite par le système opioïdergique, divers antagonistes ont été utilisés. Les résultats obtenus démontrent qu'aucun des antagonistes injectés seuls (Naltrindole, Naltrexone et Nor-BNI) ne réussit à bloquer l'interphase comme pouvait le faire le naloxone chez les femelles intactes (figure 12). Ces données suggèrent que l'inhibition opioïdergique en interphase n'est pas médiée par un seul sous-type de récepteur, mais que l'activation d'une combinaison de récepteurs est essentielle pour obtenir l'inhibition. Une interaction complexe a été postulée concernant la pharmacologie des récepteurs aux opioïdes (Rothman 1992). Afin de préciser cette interaction, nous avons effectué des tests à la formaline en présence des différentes combinaisons de sous-types de récepteurs aux opioïdes. Seulement la combinaison de Naltrindole et de Nor-BNI ainsi que la combinaison des trois antagonistes ont réussi à induire un blocage significatif de l'interphase. Par conséquent, les récepteurs delta et kappa semblent nécessaires afin que les opioïdes puissent médier leurs effets analgésiques au niveau de l'interphase du test à la formaline chez la femelle. Par contre, en regardant la figure 14b il est possible de constater que le blocage de l'interphase est plus efficace lors de l'administration des trois antagonistes que lors de l'administration du Naltrindole et du Nor-BNI. Ainsi, il semble que l'activation du récepteur mu potentialise l'effet des deux autres récepteurs opioïdergiques. Les récepteurs kappa et delta sont recrutés chez la femelle lors du phénomène d'analgésie induit par la gestation. Le profil hormonal a été démontré comme étant responsable de cette analgésie (Liu & Gintzler 2000). Il ne serait donc pas étonnant que les sous-types de récepteurs aux opioïdes impliqués dans l'interphase ne soient pas les mêmes chez les mâles et les animaux gonadectomisés, puisque leurs conditions hormonales ne sont pas la même.

Les antagonistes opioïdergiques spécifiques n'ont pas induit de modifications des niveaux de nociception en phase 1 et 2 à une exception près. Le Naltrindole induit une réduction significative des niveaux de nociception en phase 2. Fait un peu

étonnant, puisque de façon générale les antagonistes opioïdiques augmentent la douleur. Par contre, une autre étude avait déjà observé cette diminution au niveau du processus tonique de nociception du test à la formaline (Choi et al. 2003). Cette étude a démontré que plusieurs antagonistes spécifiques, tels que le Naltrexone, le Naltrindole et le Nor-BNI diminuaient les niveaux de nociception en phase 2. Le mécanisme par lequel ces antagonistes induisent de l'analgésie n'a pu être clairement identifié. Par contre, il a été proposé que ces composés peuvent bloquer des autorécepteurs inhibiteurs au niveau des neurones enképhalinergiques. Par conséquent, leurs liaisons semblent favoriser la relâche d'enképhaline en empêchant la rétro-inhibition d'avoir lieu, créant ainsi de l'analgésie (Choi et al. 2003). Les résultats obtenus au cours de ma maîtrise sont légèrement différents puisqu'aucune modification significative n'a été observée avec le Naltrexone et le Nor-BNI contrairement à Choi et collègues (2003). Pourtant, les conditions expérimentales concernant la voie d'administration et la dose étaient les mêmes, mais les animaux utilisés diffèrent. Nos résultats ont été obtenus chez des rats Sprague-Dawley femelles alors que Choi et collègues (2003) ont utilisés dans souris IRC mâles. Le modèle animal peut, à lui seul, être responsable des divergences observées (Mogil 1999).

14.3 Localisation du système opioïdique

Les mécanismes d'inhibition de la nociception peuvent se mettre en place à différents niveaux (périphérique, spinal et supraspinal) pour bloquer la transmission de l'information nociceptive. De plus, des récepteurs aux opioïdes sont présents à tous ces niveaux. Ainsi, les mécanismes d'inhibition opioïdiques présents en interphase pourraient être situés à un ou plusieurs de ces endroits. L'administration de naloxone i.p. ne permet pas de discerner l'endroit où ces mécanismes sont présents puisque cette voie d'administration induit le blocage des récepteurs aux opioïdes à tous les niveaux (périphérique, spinal et supraspinal). Par contre, différentes méthodes nous ont permis de préciser l'endroit où se situe ce mécanisme d'inhibition. Tout d'abord,

l'utilisation de naloxone méthiodide en i.p. permet de bloquer seulement les récepteurs périphériques, puisque cet antagoniste non spécifique des récepteurs opioïdiques ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, rendant impossible le blocage des récepteurs spinaux et supraspinaux. Son administration a permis de démontrer que l'effet des opioïdes dans l'interphase ne se produit pas au niveau périphérique, car aucun effet n'a été observé dans cette condition expérimentale (figure 13). Par la suite, l'injection de naloxone intrathécale a précisé l'implication des opioïdes au niveau spinal. L'injection de différentes doses de naloxone ont été effectuées entre les vertèbres lombaires 4 et 5, puisque c'est à ce niveau de la moelle que l'information nociceptive provenant de la périphérie est transmise, suite à l'injection de formaldéhyde dans la patte arrière. Le volume de naloxone injecté en intrathécale était très petit et les tests à la formaline étaient effectués peu de temps après cette injection. Par conséquent, le naloxone n'avait pas le temps d'atteindre les centres supérieurs ainsi seulement les récepteurs opioïdiques spinaux étaient bloqués. Tel qu'illustré à la figure 15 l'administration de 0.1 mg/kg de naloxone en i.t. permet de bloquer une grande portion de l'interphase. Ces données indiquent qu'une partie des mécanismes d'inhibition opioïdiques se situe au niveau spinal. Ces données vont dans le même sens que l'étude effectuée par Henry en 1999, qui proposait que les mécanismes d'inhibition de l'interphase étaient situés au niveau spinal (Henry et al. 1999). Par contre, la possibilité d'une certaine implication au niveau supraspinal ne peut être rejetée, puisque le blocage induit par les injections i.t. n'est pas tout à fait aussi important que lorsque le naloxone est administré en i.p. Des injections intracérébroventriculaires de naloxone permettraient de clarifier si les systèmes opioïdiques supraspinaux sont impliqués dans l'interphase. Par ailleurs, il se pourrait que ces systèmes opioïdiques soient situés au niveau des centres supérieurs, mais qu'ils impliquent une composante descendante d'inhibition, telle qu'impliquée dans le CIDN. La mise en place des mécanismes d'inhibition présents dans le CIDN implique la libération d'opioïdes au niveau spinal via des projections descendantes sérotoninergiques et noradrénergiques (Le Bars et al. 1979a, Le Bars et al. 1979b). Il se pourrait qu'un phénomène semblable soit aussi impliqué dans la mise

en place des mécanismes d'inhibition opioïdiques en interphase. De plus, Matthies et Franklin (1992) soutiennent que les mécanismes d'inhibition sont supraspinaux, contrairement à Henry qui propose que ces mécanismes sont spinaux (Henry et al. 1999). Les données de Matties et Henry ne sont pas incompatibles, les mécanismes d'inhibition possèdent probablement des composantes à la fois au niveau spinal et au niveau supraspinal (Henry et al. 1999, Matthies & Franklin 1992).

14.4 Implication du GABA

Chez les animaux des deux sexes, il y a des mécanismes d'inhibition faisant appel à des neuromédiateurs analgésiques qui ne sont pas de nature opioïdique, puisque le naloxone ne réussit, dans aucun cas, à bloquer complètement l'interphase. Avec tout ce qui est déjà connu dans le domaine de la douleur concernant le GABA, ce neurotransmetteur semblait avoir beaucoup de potentiel pour médier l'analgésie au niveau de l'interphase. L'utilisation de la bicuculline, un antagoniste gabaergique a permis de vérifier l'implication analgésique du GABA au niveau de l'interphase. Les résultats démontrent que le GABA est impliqué uniquement chez les mâles. En fait, le GABA semble responsable d'environ 40 % de l'inhibition de la nociception en interphase chez les mâles, alors qu'il ne semble pas être impliqué chez les femelles. Les résultats obtenus vont dans le même sens que la littérature concernant l'augmentation de la nociception en interphase chez les mâles, mais ils apportent des informations supplémentaires (Green & Dickenson 1997, Kaneko & Hammond 1997). D'un point de vue comportemental, notre étude est la première à démontrer que l'interphase implique dans des proportions aussi importantes le GABA. De plus, le rôle du GABA dans l'interphase des femelles n'avait jamais été étudié. L'administration de bicuculline dans le cadre de notre étude ne semble pas modifier les niveaux de nociception en phase 1 et 2 du test à la formaline. Ces résultats divergent de certaines études concernant la phase 2 (Green & Dickenson 1997, Kaneko & Hammond 1997). En fait, ils ont démontré que les niveaux de nociception en phase 2 sont augmentés par la bicuculline. Par contre, certains points sont à

prendre en considération concernant ces différences. Green et collègues (1997) ont utilisé des doses supraphysiologiques (50 μ g) et ont obtenu les résultats du test à la formaline grâce à de l'électrophysiologie sous anesthésie. Il est connu que l'anesthésie générale modifie la réponse neuronale à un stimulus nociceptif (Porro & Cavazzuti 1993). Les facteurs mentionnés ci-dessus peuvent à eux seuls être responsables de la divergence des résultats concernant la phase 2.

Quelques problèmes ont été rencontrés avec les doses de bicuculline. Lorsque les doses dépassaient 2 μ g, les animaux présentaient des comportements anormaux, soit beaucoup d'excitation et de vocalisation, ce qui laissait présumer en une suractivité nociceptive. Nous avons donc limité nos injections à des doses de 2 μ g. Une certaine limite a été ainsi imposée à l'étude. En fait, si nous avions été en mesure d'administrer des doses plus élevées, nous aurions peut-être réussi à bloquer une plus grande portion de l'interphase. Il se pourrait donc que le GABA soit impliqué dans une proportion plus importante que ce que nous avons déterminé lors de notre étude, et ce, chez les animaux des deux sexes. Par ailleurs, il aurait été intéressant de tester des animaux gonadectomisés, afin de vérifier leurs réponses face à un antagoniste gabaergique et ainsi déterminer le rôle des hormones sexuelles dans ces mécanismes.

Par ailleurs, puisque ni les opioïdes, ni le GABA n'arrivent à complètement bloquer l'interphase, d'autres mécanismes semblent aussi impliqués dans cette phase.

-Mâles : 20 % opioïdes, 40 % GABA et 40 % autres neuromédiateurs

-Femelles : 80 % opioïdes, 0 % GABA et 20 % autres neuromédiateurs

Chez les mâles, il se pourrait que les polyamines aient une certaine implication dans les mécanismes d'inhibition de la douleur en interphase. En fait, une étude a démontré que l'interphase du test à la formaline est presque complètement abolie chez des mâles qui sont nourris avec une diète qui induit une déficience en polyamines (Kergozien et al. 1999). Les effets des polyamines sont médiés par leurs actions sur des canaux ioniques ainsi que sur des récepteurs du glutamate. Peu d'étude animale ont été effectuée chez des femelles, il n'y a donc aucune étude qui

nous renseigne sur les autres neuromédiateurs qui pourraient modifier les niveaux de nociception en interphase. Par contre, certaines hypothèses peuvent être émises au sujet des molécules ayant un rôle potentiel, direct ou indirect, dans ces mécanismes d'inhibition. La liste de ces neuromédiateurs pourrait être exhaustive; il est certain que la 5-HT et la NA pourraient jouer un rôle dans ces mécanismes d'inhibition. Par contre, leurs implications directes dans les mécanismes d'inhibition de l'interphase sont beaucoup moins soutenues, dans la littérature, comparativement aux opioïdes et au GABA.

15. Deuxième partie : Rôle du récepteur bêta de l'estrogène dans différents processus de nociception

L'estrogène est l'HS qui a été la plus étudiée dans le domaine de la douleur, par contre les rôles de chacun de ces récepteurs demeurent inconnu dans les processus de nociception. Tel que mentionné dans l'introduction, ER- β semble être le récepteur qui médie plusieurs les fonctions non reproductrices de l'estrogène, ce qui portait à croire que ce récepteur aurait peut-être un rôle important dans la douleur. Pour ces raisons, des souris des deux sexes, normales et déficientes pour ER- β ont été utilisées, afin de démontrer que ER- β est impliqué dans les mécanismes d'inhibition de la douleur, mais pas dans les processus aigus et toniques de nociception.

15.1 Mécanismes d'inhibition de la nociception

Nos laboratoires ont démontré que l'interphase du test à la formaline est modulée par l'estrogène et la progestérone chez les rats (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Les femelles OVX présentaient des niveaux de nociception inférieurs comparativement aux femelles intactes durant cette phase. En accord avec cette étude, la différence observée au niveau de l'interphase, lors de mes travaux de maîtrise, se retrouve seulement au niveau des groupes de femelles. Chez les femelles ER- β KO,

où l'estrogène ne peut pas agir sur son récepteur bêta, les mécanismes d'inhibition de la douleur semblent être recrutés de façon plus efficace, puisque ce groupe présente une diminution significative des comportements nociceptifs en interphase comparativement aux femelles de type sauvage. Par conséquent, les effets pronociceptifs de l'estrogène semblent être médiés, du moins en partie, par ER- β . Les données de l'interphase ont été analysées selon la méthode de Tjolsen afin de vérifier si un comportement en particulier était responsable de ces différences significative (Tjolsen et al. 1992). La quantification du temps que les animaux ont passé à lécher et à lever leur patte a permis de déterminer que ce n'est pas seulement un comportement douloureux spinal (lever) ou bien un comportement supra-spinal (lécher) qui a été augmenté. En fait, les animaux WT ont une augmentation significative des levés de la patte pour la période comprise entre 6 et 30 minutes et une augmentation du léchage entre 18 et 33 minutes comparativement aux animaux KO. Par conséquent, l'estrogène augmente les comportements nociceptifs spinaux et supraspinaux en agissant sur son récepteur bêta.

15.2 Processus aigus de nociception

Deux tests de douleur ont été utilisés afin d'évaluer l'implication du ER- β dans des mécanismes aigus de nociception. Le test de la plaque chaude (douleur thermique) et la phase 1 du test à la formaline (douleur chimique) ont donné des résultats similaires (figures 17-19). Ils ont permis de déterminer que ER- β n'est pas impliqué dans les processus de nociception aigus chez les deux sexes. Parfois, l'utilisation de différents types de modalités pour analyser un même processus de nociception peut mener à des résultats différents (Mogil 1999). Par contre, dans notre cas les deux types de modalité arrivent à la même conclusion, donnant une plus grande puissance aux résultats. Le test de la plaque chaude a aussi confirmé la différence de sexe qui est très bien établi au niveau de la perception de la douleur (Mogil et al. 2000). En fait, les femelles ont des réponses nociceptives significativement plus élevées que les mâles lors du test de la plaque chaude. Par contre, lors du test à la formaline, les

femelles présentent des niveaux de nociception légèrement supérieurs aux mâles, mais cette différence n'est pas significative.

15.3 Processus tonique de nociception

La nociception de type tonique, évaluée grâce à la phase 2 du test à la formaline, ne semble pas être modulée par ER- β . Chez les deux sexes, les analyses démontrent qu'il n'y a pas de différences significatives pour la phase 2 (figures 18-19). Ces résultats sont en accord avec les données antérieures de nos laboratoires dans lesquelles la manipulation de l'estrogène et l'ovariectomie ne produisent aucun changement des niveaux de nociception en phase 2 (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002). Par contre, lorsque les courbes des femelles sont examinées avec attention, il est possible de constater que la courbe des femelles ER- β KO n'est pas complètement superposée à celle des femelles WT. En fait, les niveaux de nociception demeurent inférieurs suite à l'interphase, et ce, jusqu'à 33 min après le début du test, comparativement aux femelles WT. Cependant, lorsque la moyenne des niveaux de nociception en phase 2 est effectuée, il n'y a pas de différence entre les deux groupes de femelles. Par conséquent, des analyses statistiques ont été effectuées de façon différente en séparant la phase 2 en deux parties, soit la phase 2 précoce de 21 à 39 minutes et la phase 2 tardive de 42 à 60 minutes. De cette façon, les analyses démontrent que les deux groupes sont statistiquement différents au niveau de la phase 2 précoce ($p=0.0043$) alors qu'il n'y a pas de différence dans la phase tardive ($p=0.9143$). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette différence au niveau de la phase 2 précoce; premièrement, il se pourrait que l'interphase soit prolongée. Les mécanismes d'inhibition présents en interphase ont des effets plus importants chez les femelles ER- β KO que chez les femelles WT et peut-être que ces mécanismes sont recrutés ou bien continus d'être efficaces pour une période de temps plus longue en absence de ER- β . D'un autre côté, il se pourrait que ER- β ait une certaine implication dans les processus de douleur tonique de la phase 2.

15.4 Activité neuronale au niveau spinal

La quantification des niveaux de cellules immunoréactives pour le c-Fos au niveau spinal a été utilisée afin de vérifier le lien entre les comportements nociceptifs associés au test à la formaline et l'activité neuronale. C-Fos est une protéine issue d'un gène à activation rapide qui, de façon basale n'est que très peu exprimé. Par contre, lors d'un stress, d'une blessure ou d'une douleur considérable, sa production est de beaucoup augmentée (Orendacova et al. 2001, Hunt et al. 1987). L'expression de ce type de gène peut être corrélée à l'activité neuronale en réponse à diverses stimulations nociceptives (Harris 1998). En fait, l'expression du c-Fos est proportionnelle à l'intensité de la stimulation et est inhibée par l'administration d'analgésiques telle que la morphine (Ashmawi et al. 2003, Gogas et al. 1996, Tolle et al. 1990). Les analyses immunohistochimiques ont été effectuées à la fin des analyses comportementales. Par conséquent, ces analyses reflètent l'activité nociceptive totale du test à la formaline et non une phase en particulier. Il est très bien connu que l'expression de c-Fos est très rapide, environ une dizaine de minutes après le début du test et atteint son maximum d'expression après 2h (Hunt et al. 1987). Les analyses ont été effectuées au niveau des sections lombaires 4 et 5 de la moelle, puisque les informations nociceptives provenant de la patte arrière sont transmises au niveau de ces sections. De plus, nos analyses se sont concentrées sur des laminae particulières pour les raisons suivantes : les laminae 1-2 reçoivent les informations des fibres nociceptives C et A δ , la lamina III et les laminae IV-V reçoivent les informations des fibres non-nociceptives A β et la lamina 10 reçoit les afférences de hautes et de basses intensités (Williams et al. 1990, Besson & Chaouch 1987, Brown & Fyffe 1981). Suite aux tests à la formaline, des variations dans les niveaux de c-Fos sont seulement observables entre les groupes de femelles (figure 20). Il en va de même pour les différences comportementales associées au génotype de ER- β lors du test à la formaline. Plus précisément, ces différences comportementales sont uniquement présentes au niveau des mécanismes d'inhibitions entre les groupes de femelles. En fait, les femelles ER- β KO présentent des niveaux de nociception plus faibles en interphase et ont une expression plus faible de c-Fos dans les laminae 1-2 et

4-5. Ces laminae ont un rôle très important dans la transmission des informations nociceptives de la périphérie jusqu'aux centres supérieurs, puisque c'est à ce niveau de la moelle que se retrouvent les neurones nociceptifs (Williams et al. 1990, Besson & Chaouch 1987, Brown & Fyffe 1981). De plus, ces résultats sont en accord avec ceux de Morgan et collègues qui ont démontré que l'activation d'un mécanisme d'inhibition tel le CIDN, diminue de façon significative les niveaux de c-Fos au niveau des laminae superficielles (1-2) et profondes (particulièrement 5) de la moelle (Morgan et al. 1994). Par contre, lorsque les niveaux de c-Fos sont comparés entre les mâles et les femelles (figures 20-21), l'expression de ce gène n'est pas exactement corrélée au niveau de nociception (figures 18-19). En fait, même si les femelles ont plus d'activité nociceptive que les mâles, elles n'ont pas des niveaux de c-Fos plus élevés. Une façon d'expliquer ces résultats inattendus est que le même stimulus nociceptif peut induire des patrons différents d'expression de c-Fos au niveau du CNS chez les femelles comparativement aux mâles (Ceccarelli et al. 1999, Aloisi et al. 1997). Par conséquent, ce n'est pas surprenant que l'activité spinale de c-Fos reflète seulement les différences de nociception entre les groupes d'animaux du même sexe.

15.5 Aromatisation de la testostérone

Des études suggèrent que chez les mâles, la majeure partie des effets de la testostérone au niveau du SNC sont induits par l'estrogène, grâce à l'aromatisation de la testostérone (Evrard & Balthazart 2004a, Evrard & Balthazart 2004b, Horvath & Wikler 1999). Les résultats présentés dans la deuxième section suggèrent que le génotype pour ER- β n'influence aucun des processus de nociception étudiés lors de ma maîtrise chez les mâles. Ces résultats permettent de croire que l'estrogène obtenu suite à l'aromatisation n'agit pas sur ER- β dans les processus de nociception. Par conséquent, l'estrogène ainsi formé peut agir sur ER- α ou bien sur d'autres ER membranaires qui sont beaucoup moins caractérisés et qui semblent être impliqués dans les effets non génomiques de l'estrogène. Il a été démontré que l'aromatisation

de la testostérone en estrogène est un phénomène très présent dans les laminae 1-2 et que l'estrogène ainsi formé altère le processus de transmission nociceptif (Evrard et al. 2000, Blomqvist 2000). De plus, les laminae 1 et 2 de la corne dorsale de la moelle expriment préférentiellement le sous-type ER- α (Evrard & Balthazart 2002, Amandusson et al. 1995, Keefer et al. 1973). Par conséquent, les effets de la testostérone sur la nociception qui sont médiés via l'aromatisation en estrogène pourraient impliquer ER- α chez le mâle.

15.6 Neurotransmetteurs associés à ER- β

Des études ont démontré que ER- β est le récepteur qui est responsable de certaines fonctions importantes de l'estrogène tel que l'anxiété (Imwalle et al. 2005), l'apprentissage spatial (Rissman et al. 2002) et la dépression (Rocha et al. 2005). Ces effets reliés à ER- β semblent tous associés au système sérotoninergique. Imwalle et collègues ont démontré que les femelles ER- β KO étaient plus anxieuses et présentaient des modifications dans la concentration en 5-HT ou bien en dopamine dans plusieurs régions du SNC (Imwalle et al. 2005). De plus, la 5-HT est un neurotransmetteur qui joue un rôle très important dans les mécanismes d'inhibition de la douleur, tels que le CIDN (Le Bars et al. 1979a, Le Bars et al. 1979b), qui est très caractérisé tant chez l'humain que chez l'animal. Par conséquent, il se pourrait qu'en empêchant l'estrogène d'agir sur son récepteur bêta, les mécanismes d'inhibition soient recrutés plus efficacement suite à des modifications dans le système sérotoninergique.

16. Retombés cliniques potentiels

L'étude des différences dans les mécanismes d'inhibition est très intéressante et permet de mieux comprendre la prévalence de certaines maladies de douleurs chroniques chez la femme et ainsi limiter l'expansion de ce phénomène. En fait, la prévalence de certaines maladies chroniques chez les femmes telles que la

fibromyalgie, le syndrome du colon irritable et la polyarthrite rhumatoïde semblent être reliés à un déficit dans les mécanismes d'inhibition de la douleur plutôt qu'à une augmentation de l'activité nociceptive (Julien & Marchand 2005, Pielsticker et al. 2005, Staud et al. 2001). Une certaine nuance aux hypothèses mentionnées ci-dessus a été apportée par nos résultats. En fait, un déficit dans les mécanismes d'inhibition de la douleur semble être intimement associé à une augmentation de l'activité neuronale au niveau spinal. De façon générale, il est connu que les mécanismes d'inhibition sont recrutés moins efficacement chez les femelles que chez les mâles (Gaumond et al. 2005, Gaumond et al. 2002, Klein et al. 1998). De plus, les femelles chez qui les mécanismes d'inhibition sont recrutés moins efficacement présentent des niveaux d'activation neuronale plus importants. Avec le temps, la stimulation plus importante des neurones nociceptifs spinaux pourrait mener à une sensibilisation de ces neurones. Cette sensibilisation pourrait faciliter la transmission nociceptive des stimulations de plus faibles intensités et ainsi prédisposer à des douleurs chroniques. Beaucoup de recherche reste encore à être faite dans ce domaine. La caractérisation du rôle de chacun des autres récepteurs aux HS sera la prochaine étape dans nos laboratoires et apportera des informations complémentaires très intéressantes. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la douleur sont très différents entre les mâles et les femelles, tout particulièrement lorsqu'il est question des mécanismes d'inhibition de la douleur. La caractérisation des neuromédiateurs impliqués dans les mécanismes d'inhibition de la douleur chez le mâle et chez la femelle permettra de mieux comprendre ces différences et ainsi orienter ultimement les traitements pharmacologiques selon le sexe.

Remerciements

Premièrement, je voudrais remercier Isabelle Gaumond qui m'a enseigné plusieurs techniques avec sa rigueur scientifique et son souci du détail. De plus, pour ton aide très apprécié lors des journées d'expérimentation chargées, un gros merci!

Je remercie énormément Patricia Robichaud, qui, lors de son stage d'été, a participé à de nombreuses expériences, ensoleillant les journées entre les murs de l'animalerie. Merci à Karine Belleville pour son aide avec l'immunohistochimie, tu m'as enlevé une charge considérable.

Je voudrais aussi remercier tous les étudiants du laboratoire du Dr Marchand, particulièrement Yannick Tousignant-Laflamme, Philippe Goffraux, Juliana Barcellos de Souza et Stéphanie Pagé. Premièrement, Yannick pour ses réponses à mes nombreuses questions et ses conseils judicieux. Philippe pour son aide avec les statistiques, pour les corrections de mes écrits en anglais, ainsi que pour sa compréhension très appréciée. Juliana et Stéphanie pour votre amitié et votre soutien, je vous adore !

Un merci spécial à Maxime Gallant qui m'a encouragé et soutenu tout au long de ma maîtrise. Tes nombreux conseils et ton expertise m'ont été souvent très utiles. Merci d'avoir été là, je l'apprécie beaucoup.

Finalement, je voudrais remercier tout particulièrement mon directeur de maîtrise, Dr Serge Marchand, de m'avoir accueillie dans ses laboratoires, de m'avoir fourni l'encadrement nécessaire tout en me laissant beaucoup d'autonomie et de responsabilités. J'ai adoré ces deux années passées dans vos laboratoires, merci beaucoup pour toutes ces connaissances que vous m'avez apportées.

Références

- Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF. 1995. The Formalin Test - Scoring Properties of the First and 2Nd Phases of the Pain Response in Rats. *Pain* 60(1):91-102
- Aloisi AM. 2000. Sensory effects of gonadal hormones. In *Sex, Gender and Pain*, ed. RB Fillingim, 7-24. Seattle.
- Aloisi AM. 2003. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. *Clin. J. Pain* 19(3):168-74
- Aloisi AM, Ceccarelli I. 2000. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neurosci* 95(2):559-66
- Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. 2003. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007:232-7
- Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. 2004. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci. Lett.* 361(1-3):262-4

Aloisi AM, Della SD, Rendo C, Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Farabollini F. 2002.

Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. *Brain Res.* 937(1-2):1-7

Aloisi AM, Zimmermann M, Herdegen T. 1997. Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-Fos expression in the septum and hippocampus of the rat. *Neurosci* 81(4):951-8

Amandusson A, Hallbeck M, Hermanson O, Blomqvist A. 1999. Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. *Pain* 83:243-8

Amandusson A, Hermanson O, Blomqvist A. 1995. Estrogen receptor-like immunoreactivity in the medullary and spinal dorsal horn of the female rat. *Neurosci. Lett.* 196(1-2):25-8

Anderberg UM, Marteinsdottir I, Theorell T, von Knorring L. 2000. The impact of life events in female patients with fibromyalgia and in female healthy controls. *Eur. Psychiatry* 15(5):295-301

Ashmawi HA, Chambergó FS, raujo Palmeira CC, de PP, I. 2003. The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA C-fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth. Analg.* 97(2):541-6, table

Barbaccia ML, Roscetti G, Bolacchi F, Concas A, Mostallino MC et al. 1996. Stress-induced increase in brain neuroactive steroids: antagonism by abecarnil.

Pharmacol. Biochem. Behav. 54(1):205-10

Barber J, Gitelson J. 1980. Cancer pain: psychological management using hypnosis.

CA Cancer J. Clin. 30(3):130-6

Berkley KJ. 1997. Sex differences in pain. *Behav. Brain Sci.* 20(3):371-80

Besson JM, Chaouch A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception.

Physiol Rev. 67(1):67-186

Blomqvist A. 2000. Sex hormones and pain: a new role for brain aromatase? *J. Comp*

Neurol. 423(4):549-51

Bradley LA, Kendree-Smith NL, Alarcon GS. 2000. Pain complaints in patients with fibromyalgia versus chronic fatigue syndrome. *Curr. Rev. Pain* 4(2):148-57

Brown AG, Fyffe RE. 1981. Form and function of dorsal horn neurones with axons

ascending the dorsal columns in cat. *J. Physiol* 321:31-47

- Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Aloisi AM. 1999. Effects of formalin pain on hippocampal c-Fos expression in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64(4):797-802
- Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. 2003. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. *Pain* 104(1-2):35-47
- Chauvin M, Beaulieu P. 2005. Pharmacologie des opioïdes. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, 2:39-77. Les presses de l'Université de Montréal.
- Choi SS, Han KJ, Lee HK, Han EJ, Suh HW. 2003. Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75(2):447-57
- Cogan R, Spinnato JA. 1986. Pain and discomfort thresholds in late pregnancy. *Pain* 27(1):63-8
- Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. 2004. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur. J. Pain* 8(5):397-411
- Cutolo M. 2000. Sex hormone adjuvant therapy in rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 26(4):881-95

- Das A, Chaudhuri SK. 1995. Effects of sex steroids on the concentrations of some brain neurotransmitters in male and female rats: some new observations. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 39(3):223-30
- Dawson-Basoa M, Gintzler AR. 1997. Involvement of spinal cord delta opiate receptors in the antinociception of gestation and its hormonal simulation. *Brain Res.* 757(1):37-42
- Dawson-Basoa ME, Gintzler AR. 1996. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain* 64(3):608-15
- Deroo BJ, Korach KS. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest* 116(3):561-70
- Desjardins GC, Beaudet A, Meaney MJ, Brawer JR. 1995. Estrogen-induced hypothalamic beta-endorphin neuron loss: a possible model of hypothalamic aging. *Exp. Gerontol.* 30(3-4):253-67
- Dessein PH, Shipton EA, Joffe BI, Hadebe DP, Stanwix AE, Van der Merwe BA. 1999. Hyposecretion of adrenal androgens and the relation of serum adrenal steroids, serotonin and insulin-like growth factor-1 to clinical features in women with fibromyalgia. *Pain* 83(2):313-9

- Dickenson AH, Rivot J-P, Chaouch A, Besson J-M, Le Bars D. 1981. Diffuse Noxious Inhibitory Controls (DNIC) in the rat with and without pCPA pretreatment. *Brain Res.* 216:313-21
- Dondi D, Limonta P, Maggi R, Piva F. 1992. Effects of ovarian hormones on brain opioid binding sites in castrated female rats. *Am. J. Physiol* 263(3 Pt 1):E507-E511
- Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4(2):161-74
- Eckersell CB, Popper P, Micevych PE. 1998. Estrogen-induced alteration of mu-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J. Neurosci.* 18(10):3967-76
- Evrard H, Baillien M, Foidart A, Absil P, Harada N, Balthazart J. 2000. Localization and controls of aromatase in the quail spinal cord. *J. Comp Neurol.* 423(4):552-64
- Evrard HC, Balthazart J. 2002. Localization of oestrogen receptors in the sensory and motor areas of the spinal cord in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J. Neuroendocrinol.* 14(11):894-903

- Evrard HC, Balthazart J. 2004a. Aromatization of androgens into estrogens reduces response latency to a noxious thermal stimulus in male quail. *Horm. Behav.* 45(3):181-9
- Evrard HC, Balthazart J. 2004b. Rapid regulation of pain by estrogens synthesized in spinal dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 24(33):7225-9
- Filligim RB. 2000. Sex, gender, and pain: women and men really are different. *Curr. Rev. Pain* 4(1):24-30
- Filligim RB, Gear RW. 2004. Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur. J. Pain* 8(5):413-25
- Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. 2002. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 958(1):139-45
- Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. 2005. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 1052(1):105-11
- Gogas KR, Levine JD, Basbaum AI. 1996. Differential contribution of descending controls to the antinociceptive actions of kappa and mu opioids: an analysis of formalin-evoked C-fos expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276(2):801-9

- Green GM, Dickenson A. 1997. GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neuronal responses to formalin in the rat spinal cord. *Eur. J. Pain* 1(2):95-104
- Hammer RP. 1984. The sexually dimorphic region of the preoptic area in rats contains denser opiate receptor binding sites in females. *Brain Res.* 308(1):172-6
- Hammer RP. 1985. The sex hormone-dependent development of opiate receptors in the rat medial preoptic area. *Brain Res.* 360(1-2):65-74
- Harris JA. 1998. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res. Bull.* 45(1):1-8
- Hau M, Dominguez OA, Evrard HC. 2004. Testosterone reduces responsiveness to nociceptive stimuli in a wild bird. *Horm. Behav.* 46(2):165-70
- Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. 1999. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology* 140(7):3255-63
- Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. 1999. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* 82(1):57-63

Hogeweg JA, Langereis MJ, Bernards AT, Faber JA, Helders PJ. 1992. Algometry.

Measuring pain threshold, method and characteristics in healthy subjects.

Scand. J. Rehabil. Med. 24(2):99-103

Holtzman DA, Brooks PJ, Pfaff DW, Schwartz-Giblin S. 1997. Preproenkephalin

mRNA is regulated by an interaction between steroid hormones and

nociceptive stimulation. *J. Neuroendocrinol.* 9(12):913-22

Horvath TL, Wikler KC. 1999. Aromatase in developing sensory systems of the rat

brain. *J. Neuroendocrinol.* 11(2):77-84

Houghton LA, Jackson NA, Whorwell PJ, Morris J. 2000. Do male sex hormones

protect from irritable bowel syndrome? *Am. J. Gastroenterol.* 95(9):2296-300

Hunt SP, Pini A, Evan G. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons

following sensory stimulation. *Nature* 328(6131):632-4

IASP. 1979. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 6(3):249

IASP. 1982. Pain terms: A supplementary note. *Pain* 14:205-6

- Imwalle DB, Gustafsson JA, Rissman EF. 2005. Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav.* 84(1):157-63
- Julien N, Marchand S. 2005. Endogenous pain inhibitory systems activated by spatial summation are opioid-mediated. *Pain Res. Manag.* 10(2):92 (Abstr.)
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852):203-10
- Kaergaard A, Hansen AM, Rasmussen K, Andersen JH. 2000. Association between plasma testosterone and work-related neck and shoulder disorders among female workers. *Scand. J. Work Environ. Health* 26(4):292-8
- Kaneko M, Hammond DL. 1997. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282(2):928-38
- Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomqvist A. 1999. Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.* 275(2):85-8

- Kaur G, Kulkarni SK. 2002. Evidence for serotonergic modulation of progesterone-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. *Brain Res.* 943(2):206-15
- Kavaliers M, Colwell DD, Perrot-Sinal TS. 1997. Opioid and non-opioid NMDA-mediated predator-induced analgesia in mice and the effects of parasitic infection. *Brain Res.* 766(1-2):11-8
- Keefer DA, Stumpf WE, Sar M. 1973. Estrogen-topographical localization of estrogen-concentrating cells in the rat spinal cord following 3 H-estradiol administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143(2):414-7
- Kelly MJ, Qiu J, Wagner EJ, Ronnekleiv OK. 2002. Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83(1-5):187-93
- Kergozien S, Delcros JG, Desury D, Moulinoux JP. 1999. Polyamine deprivation alters formalin-induced hyperalgesia and decreases morphine efficacy. *Life Sci.* 65(21):2175-83
- Klein LC, Popke EJ, Grunberg NE. 1998. Sex differences in effects of opioid blockade on stress-induced freezing behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61(4):413-7

- Koch H. 1986. *The management of chronic pain in office-based ambulatory care: National Ambulatory Medical Care Survey. Rep. PHS 86-1250*, Hyattsville
- Kuttner L. 1988. Favorite stories: a hypnotic pain-reduction technique for children in acute pain. *Am. J. Clin. Hypn.* 30(4):289-95
- Lacroix-Fralish ML, Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. 2006. Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. *Neurosci* 138(2):601-8
- Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S. 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER alpha and ER beta) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of Neurobiology* 36(3):357-78
- Le Bars D, Adam F. 2002. [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 21(4):315-35
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. 1979a. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). 1. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283-304 (a)

- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. 1979b. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 6:305-27(b)
- Linton SJ, Gotestam KG. 1984. A controlled study of the effects of applied relaxation and applied relaxation plus operant procedures in the regulation of chronic pain. *Br. J. Clin. Psychol.* 23 (Pt 4):291-9
- Lipka SM, Kavaliers M. 1990. Sex differences in the inhibitory effects of the NMDA antagonist, MK-801, on morphine and stress-induced analgesia. *Brain Res. Bull.* 24(4):627-30
- Liu NJ, Gintzler AR. 2000. Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. *Pain* 85(1-2):273-81
- MacLusky NJ, McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274(5668):276-8
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18(1):22-9

- Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, 1:3-37. Les presses de l'Université de Montréal.
- Marcus DA. 1995. Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain* 62(2):129-39
- Martin M, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL. 2003. Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: distinct mu, delta and kappa tones. *Eur. J. Neurosci.* 17(4):701-8
- Matson SC, Henderson KA, McGrath GJ. 1997. Physical findings and symptoms of depot medroxyprogesterone acetate use in adolescent females. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 10(1):18-23
- Matthies BK, Franklin KBJ. 1992. Formalin Pain Is Expressed in Decerebrate Rats But Not Attenuated by Morphine. *Pain* 51:199-206
- Melzack R, Wall PD. 1965. Pain mechanisms: A new theory. *Science* 150:971-9
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51(1):63-81

- Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndroms and definition of pain terms. 2nd edition IASP Press, Seattle . 1994.
Ref Type: Journal (Full)
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C et al. 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor.
Nature 377(6549):532-5
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66(6):355-474
- Miller MF, Barabasz AF, Barabasz M. 1991. Effects of active alert and relaxation hypnotic inductions on cold pressor pain. *J. Abnorm. Psychol.* 100(2):223-6
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA et al. 2003.
Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144(5):2055-67
- Mogil JS. 1999. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(14):7744-51
- Mogil JS, Belknap JK. 1997. Sex and genotype determine the selective activation of neurochemically-distinct mechanisms of swim stress-induced analgesia.
Pharmacol. Biochem. Behav. 56(1):61-6

- Mogil JS, Chesler EJ, Wilson SG, Juraska JM, Sternberg WF. 2000. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(3):375-89
- Mogil JS, Sternberg WF, Kest B, Marek P, Liebeskind JC. 1993. Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain* 53(1):17-25
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C et al. 1994. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341(1):33-8
- Morgan MM, Gogas KR, Basbaum AI. 1994. Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord. *Pain* 56(3):347-52
- Myers CD, Riley JL, III, Robinson ME. 2003. Psychosocial contributions to sex-correlated differences in pain. *Clin. J. Pain* 19(4):225-32
- Navarro MA, Nolla JM, Machuca MI, Gonzalez A, Mateo L et al. 1998. Salivary testosterone in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 25(6):1059-62

- Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. 1998. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. *Brain Res.* 814(1-2):194-8
- Orendacova J, Marsala M, Cizkova D, Kafka J, Racekova E et al. 2001. Fos protein expression in sacral spinal cord in relation to early phase of cauda equina syndrome in dogs. *Cell Mol. Neurobiol.* 21(4):413-9
- Pan ZZ. 1998. mu-Opposing actions of the kappa-opioid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 19(3):94-8
- Pasternak GW. 1993. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin. Neuropharmacol.* 16(1):1-18
- Patterson DR, Questad KA, Boltwood MD. 1987. Hypnotherapy as a treatment for pain in patients with burns: research and clinical considerations. *J. Burn Care Rehabil.* 8(4):263-8
- Pielsticker A, Haag G, Zaudig M, Lautenbacher S. 2005. Impairment of pain inhibition in chronic tension-type headache. *Pain* 118(1-2):215-23

- Porro CA, Cavazzuti M. 1993. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog. Neurobiol.* 41(5):565-607
- Rainville P, Carrier B, Hofbauer RK, Bushnell MC, Duncan GH. 1999. Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain* 82(2):159-71
- Rainville P, Hofbauer RK, Bushnell MC, Duncan GH, Price DD. 2002. Hypnosis modulates activity in brain structures involved in the regulation of consciousness. *J. Cogn Neurosci.* 14(6):887-901
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA et al. 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270(5237):792-4
- Riley JL, III, Robinson ME, Wise EA, Myers CD, Fillingim RB. 1998. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. *Pain* 74(2-3):181-7
- Riley JL, III, Robinson ME, Wise EA, Price DD. 1999. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain* 81(3):225-35

- Rissman EF, Heck AL, Leonard JE, Shupnik MA, Gustafsson JA. 2002. Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99(6):3996-4001
- Rocha BA, Fleischer R, Schaeffer JM, Rohrer SP, Hickey GJ. 2005. 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179(3):637-43
- Romero MT, Bodnar RJ. 1986. Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol Behav.* 37(6):893-7
- Rothman RB. 1992. A Review of the Role of Anti-Opioid Peptides in Morphine Tolerance and Dependence. *Synapse* 12:129-38
- Russell IJ. 1998. Neurochemical pathogenesis of fibromyalgia. *Z. Rheumatol.* 57 Suppl 2:63-6
- Schutzer WE, Bethea CL. 1997. Lack of ovarian steroid hormone regulation of norepinephrine transporter mRNA expression in the non-human primate locus coeruleus. *Psychoneuroendocrinology* 22(5):325-36

- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 388(4):507-25
- Simonian SX, Herbison AE. 1997. Differential expression of estrogen receptors and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons. *Neurosci* 76:517-29
- Sinchak K, Eckersell C, Quezada V, Norell A, Micevych P. 2000. Preproenkephalin mRNA levels are regulated by acute stress and estrogen stimulation. *Physiol Behav.* 69(4-5):425-32
- Sluka KA, Walsh D. 2003. Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *J. Pain* 4(3):109-21
- Spiegel D. 1991. Uses of hypnosis in managing medical symptoms. *Psychiatr. Med.* 9(4):521-33
- Staud R, Vierck CJ, Cannon RL, Mauderli AP, Price DD. 2001. Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome. *Pain* 91(1-2):165-75

- Stein C, Machelska H, Schafer M. 2001. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z. Rheumatol.* 60(6):416-24
- Talbot JD, Duncan GH, Bushnell MC. 1987. Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICS) on discrimination of noxious heat stimuli in humans. *Pain (Supplement)* 4:p.116-#219 (Abstr.)
- Talbot JD, Duncan GH, Bushnell MC. 1989. Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICs) on the sensory-discriminative dimension of pain perception. *Pain* 36:231-8
- Temple JL, Wray S. 2005. Bovine serum albumin-estrogen compounds differentially alter gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity. *Endocrinology* 146(2):558-63
- Thomas BL. 1988. Self-esteem and life satisfaction. *J. Gerontol. Nurs.* 14(12):25-30
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. 1992. The Formalin Test - An Evaluation of the Method. *Pain* 51:5-17
- Tolle TR, Castro-Lopes JM, Coimbra A, Zieglansberger W. 1990. Opiates modify induction of c-fos proto-oncogene in the spinal cord of the rat following noxious stimulation. *Neurosci. Lett.* 111(1-2):46-51

- Tsai MJ, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-86
- Unruh AM. 1996. Gender variations in clinical pain experience. *Pain* 65(2-3):123-67
- Valente SM. 1991. Using hypnosis with children for pain management. *Oncol. Nurs. Forum* 18(4):699-704
- Velle W. 1987. Sex differences in sensory functions. *Perspect. Biol. Med.* 30(4):490-522
- Von KM, Dworkin SF, Le RL, Kruger A. 1988. An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain* 32(2):173-83
- Whipple B, Josimovich JB, Komisaruk BR. 1990. Sensory thresholds during the antepartum, intrapartum and postpartum periods. *Int. J. Nurs. Stud.* 27(3):213-21
- Wiesenfeld-Hallin Z. 2005. Sex differences in pain perception. *Gend. Med.* 2(3):137-45

Williams S, Evan GI, Hunt SP. 1990. Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. *Neurosci* 36(1):73-81

Zinder O, Dar DE. 1999. Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. *Acta Physiol Scand.* 167(3):181-8